

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 3 月 1 日 (01.03.2001)

PCT

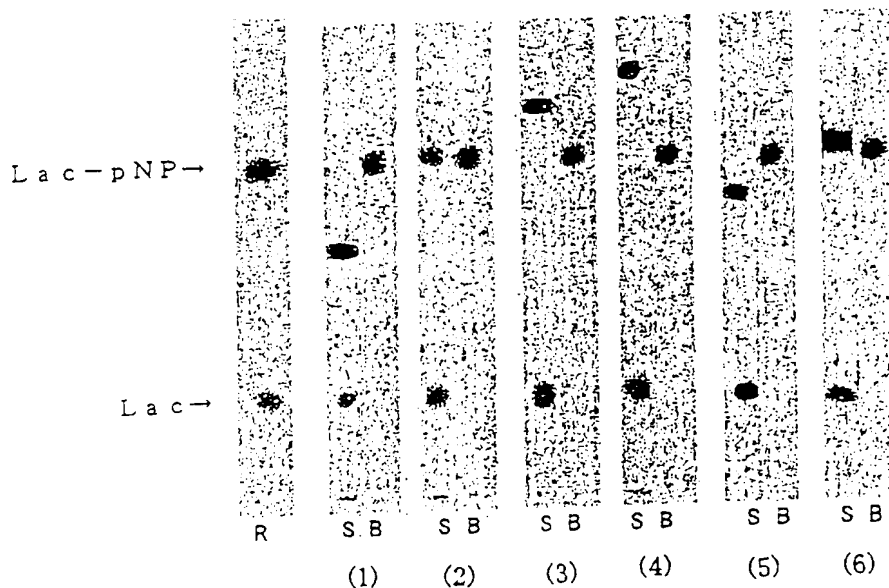
(10) 国際公開番号
WO 01/14575 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 19/14, C07H 15/04, 3/06, 15/08
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05576
(22) 国際出願日: 2000 年 8 月 18 日 (18.08.2000)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願平 11/233262 1999 年 8 月 19 日 (19.08.1999) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 昭和産業株式会社 (SHOWA SANGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒101-8521 東京都千代田区内神田 2 丁目 2 番 1 号 Tokyo (JP).
(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 安武 望 (YASUTAKE, Nozomu) [JP/JP]; 三吉新介 (MIYOSHI, Shin-suke) [JP/JP]; 〒305-0003 茨城県つくば市桜 1 丁目 16 番 昭和産業株式会社 総合研究所 バイオ研究センター内 Ibaraki (JP). 碓永泰市 (USUI, Taiichi) [JP/JP]; 〒422-8021 静岡県静岡市小鹿 1739-7 Shizuoka (JP). 村田健臣 (MURATA, Takeomi) [JP/JP]; 〒422-8021 静岡県静岡市小鹿 3 丁目 3 番 2-10-15 号 Shizuoka (JP). 戸谷一英 (TOTANI, Kazuhide) [JP/JP]; 〒422-8021 静岡県静岡市小鹿 913-3 208 号 Shizuoka (JP).
(74) 代理人: 弁理士 南條博道 (NANJO, Hiromichi); 〒530-0047 大阪府大阪市北区西天満 3 丁目 2 番 9 号 翁ビル 5 階 Osaka (JP).
(81) 指定国 (国内): AU, CA, JP, KR, US.

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING GLYCOSIDES

(54) 発明の名称: 配糖体の製造方法



(57) Abstract: A process for efficiently and economically producing a lactosyl glycoside and an N-acetylglucosaminyl glycoside, which are useful as foods, functional food materials, drugs and reagents, by using a transfer reaction represented by the following general formula in the presence of an enzyme having an activity of cleaving a β 1,4 glycosyl bond: $\text{LacA-X} + \text{Y} \rightarrow \text{LacA-Y} + \text{X}$ wherein LacA represents lactose or N-acetylglucosamine; X represents hydrogen (H), a saccharide, a glycoconjugate or a phenolic compound; and Y represents a compound having alcoholic hydroxy or phenolic hydroxy.

[続葉有]

WO 01/14575 A1



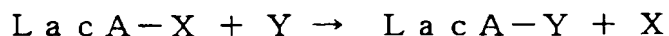
(84) 指定国/広域: ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:
国際調査報告書

(57) 要約:

β 1, 4 グルコシル結合切断活性を有する酵素の存在下、次式:



(式中、LacAはラクトースまたはN-アセチルラクトサミンを、Xは水素(H)、糖質、複合糖質、またはフェノール性化合物を、Yはアルコール性水酸基またはフェノール性水酸基を有する化合物をそれぞれ表す。)で表わされる転移反応を用い、食品、機能性食品素材、医薬品および試薬として有用なラクトシル配糖体およびN-アセチルラクトサミニル配糖体を、高収率で、かつ、安価に供給する。

明 細 書

配糖体の製造方法

5 技術分野

本発明は、ラクトシル配糖体またはN-アセチルラクトサミニル配糖体の製造方法に関する。さらに詳しくは、 β -1, 4-グルコシル結合を切断する活性を有する酵素を用いるラクトシル配糖体またはN-アセチルラクトサミニル配糖体の製造方法に関する。

10

背景技術

糖質および複合糖質（糖蛋白質、糖脂質、配糖体など）は、生物細胞、体液、果実、種子など動・植物に存在し、細胞膜表面における生体情報の伝達、細胞の形態形成、蛋白質との共有結合による高次構造の維持など、遺伝子や蛋白質と同様に生体機能の維持・調節に不可欠な機能を担っていることが明らかにされてきている。

複合糖質である糖脂質は、スフィンゴ糖脂質、グリセロ糖脂質などに分類される。スフィンゴ糖脂質は、大部分が動物組織に存在し、その基本糖鎖の構造によってグロボ系、ラクト系、ガングリオ系、ガラ系のおおよそ4つの系列に大別される。このうち、グロボ系、ラクト系、ガングリオ系の3つは、ラクトース構造を有し、セラミドにラクトースが結合したラクトシルセラミドを基本骨格としており、つぎに付加される糖質によって分類されている。

このラクトシルセラミドは、Gal β 1-4 Glcユニット、すなわちラクトースユニットを有しているが、細菌が複合糖質の配列を認識する際、このラクトースユニットを認識することが知られるようになり、微生物が宿主細胞に糖鎖を介して接着するというメカニズムは、細胞と細胞の認識作用のモデル

25

として重要な役割を示している。さらに、細菌は細胞表面にある糖鎖の末端部分だけを認識して結合するだけではなく、糖鎖内部にある糖鎖構造を認識することがわかってきた。例：大腸菌、シュードモナス属菌、放線菌、プロピオン酸菌は糖鎖の内部にあるラクトース構造も認識することが知られている。

このように、このラクトシルセラミドは、細胞の接着などの生理学的に重要な機能を担っている。従って、ラクトシル配糖体は、医療、食品などの用途に利用できるが、その製造が容易ではないのが実状である。

複合糖質である配糖体にも多くの種類がある。例えば、グリセロールをアグリコンとするグルコース、ガラクトース、N-アセチルラクトサミンの配糖体が知られてる。グルコースの配糖体としては、グリセリルグルコシド (2-O- α -D-Glucosylglycerol、(2R)-1-O- α -D-Glucosylglycerol、および (2S)-1-O- α -D-Glucosylglycerol) などの天然物質が知られている。ガラクトースの配糖体としては、化学合成物質として、グリセリルガラクトシド (1-O- β -D-Galactosylglycerol) が知られている。また、N-アセチルラクトサミニル配糖体としては、(O- β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-2-Acetylamino-2-deoxyl-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-Glycerin) の存在が報告されている。

上記の配糖体のうち、グリセリルグルコシド、グリセリルガラクトシドなどは味質や保湿性、生理機能に特徴を有する物質である。また、これらの物質はグリセロ糖脂質の合成原料としても有用である。グリセロ糖脂質は微生物から高等植物に至るまで広く生体に存在し、乳化安定性や発ガンプロモーター抑制効果などが報告されている。従って、異なる構造の糖がグリセロールに付加した化合物は新たな機能や新たなグリセロ糖脂質の原料としての応用が期待できる。

また、N-アセチルラクトサミニル配糖体は、ブドウ状球菌が認識するレ

セプター、あるいはインフルエンザウイルスAおよびB、センダイウイルス、ニューカッスル病ウイルスなどが認識する糖鎖構造のコア部分に存在することが知られており、細胞の認識に関与するので、医療用途に有用であるが、その製造が容易ではないのが実状である。

- 5 このような糖関連物質の機能に注目し、その機能をさらに向上させ、あるいはその生理機能を改変して、医療、食品などの用途に利用すべく、糖鎖および複合糖質の修飾・置換研究（リモデリング）が行われている。

糖質および複合糖質の糖鎖のリモデリングの方法には、化学的な方法と酵素的な方法、および双方を組み合わせた方法がある。

- 10 化学的な方法として有機合成法による糖鎖合成があるが、この方法は操作が煩雑である上、副生産物の除去（目的物質の精製）工程が必要となる。さらに、人体に有害な試薬を用いることが多く、廃液による周辺環境への影響が危惧されるという問題点がある。

- 15 他方、糖鎖を酵素的にリモデリングする方法としては、転移酵素またはエキソグルコシダーゼを用いる方法、エンドグルコシダーゼを用いる方法などが知られている。

- 20 転移酵素またはエキソグルコシダーゼを用いる方法として、D. H. ジョジアッセ (D. H. Joziassse) ら Eur. J. Biochem.、第191巻、第75～83頁 (1990) には、エキソグルコシダーゼまたはグルコシルトランスフェラーゼを用いて、糖鎖の非還元末端にグルコシル基を逐次添加していく方法が記載されている。

- 25 しかし、エキソグルコシダーゼまたはグルコシルトランスフェラーゼを用いた糖鎖合成は、化学的合成に比べると容易であるが、それでも糖残基一つ一つについてその酵素反応を逐次的に行う必要があるので、多数の反応ステップを行う必要があり、煩雑であるという問題がある。

エンドグルコシダーゼを用いる糖転移反応として、R. B. トリムブル

(R. B. Trimble) ら J. Biol. Chem.、第 261 巻、第 12000～12005 頁 (1986) には、フラボバクテリウム・メニンゴセプトチカム (Flavobacterium meningosepticum) 由来のエンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼを用いる方法が記載されている。R. M. バーデールス (R. M. Bardales) ら J. Biol. Chem.、第 264 巻、第 19893～19897 頁 (1989) にはディプロコッカス・ニューモニエ (Diprococcus pneumoniae) 由来のエンドー α -N-アセチルガラクトサミニダーゼを用いる方法が記載されている。さらに、特開平 5-64594 号公報には、アルスロバクター・プロトホルミエ (Arthrobacter protophormiae) 由来のエンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼによる糖質への高マンノース型糖鎖の転移反応が記載されている。また、K. ヤマモト (K. Yamamoto) ら Biochem. Biophys. Res. Commun.、第 203 巻、第 244～252 頁 (1994) にはムコール・ヒエマリス (Mucor hiemalis) 由来のエンドー β -アセチルグルコサミニダーゼによる糖質への糖鎖転移反応が記載されている。さらに、特開平 10-245402 号公報には、エンドー β -N-アセチルグルコサミニダーゼを用いた (Man) 6-GlcNAc の転移反応が記載され、特開平 10-33194 号公報には、ラクトー N-ビオシダーゼを用いた Gal β 1-3GlcNAc の転移反応が記載されている。

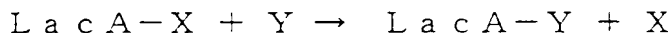
このように、エンドグルコシダーゼで様々な糖鎖を転移する例が報告されているが、ラクトースまたは N-アセチルラクトサミンを転移させた例はこれまでに報告されていない。

従って、ラクトシル配糖体または N-アセチルラクトサミニル配糖体の簡便な製造方法が望まれている。

発明の開示

本発明は、 β 1, 4 グルコシル結合切断活性を有する酵素の存在下、次

式：



5 (式中、Lac AはラクトースまたはN-アセチルラクトサミンを、Xは水素(H)、糖質、複合糖質、またはフェノール性化合物を、Yはアルコール性水酸基またはフェノール性水酸基を有する化合物をそれぞれ表す。)で表わされる転移反応を用いることを特徴とする、ラクトシル配糖体またはN-アセチルラクトサミニル配糖体の製造方法に関する。

10 好ましい実施態様においては、前記Yがアルコール性水酸基を有する化合物である。

別の好ましい実施態様においては、前記アルコール性水酸基を有する化合物が脂肪族アルコールまたは糖質である。

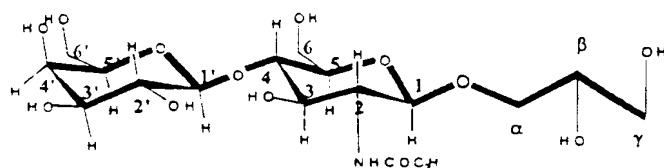
さらに別の好ましい実施態様においては、前記アルコール性水酸基を有する化合物が、セリンまたはスレオニン残基を有するアミノ酸、ペプチドまたは蛋白質である。

好ましい実施態様においては、Xが水素である。

また、好ましい実施態様においては、前記β-1, 4グルコシル結合を切断する活性を有する酵素が、エキソセロビオヒドラーゼ、β-D-グルコシダーゼ、および/またはセルラーゼである。

20 本発明は、また、以下の構造式(I)で示される、グリセリルN-アセチルラクトサミニド (O-β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-O-β-D-2-Acetylamin o-2-deoxyl-Glucopyranosyl-(1→1)-Glycerin) に関する。

25



(I)

図面の簡単な説明

第1図は、L a c - p N P のラクトシル基の脂肪族アルコールへの転移反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

第2図はエチルラクトシドの¹H-NMRである。

5 第3図はエチルラクトシドの質量分析スペクトルである。

第4図は、L a c - p N P のラクトシル基の、アミノ酸への転移反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

第5図は、L a c - p N P のラクトシル基の、単糖への転移反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

10 第6図は、L a c - p N P のラクトシル基の、L-メントールへの転移反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

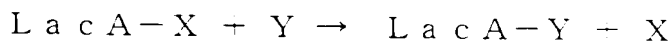
第7図は、L a c N A c - p N P のN-アセチルラクトサミニル基の、脂肪族アルコールへの転移反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

15 第8図は、ラクトースと脂肪族アルコールまたは単糖との縮合反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

第9図は、N-アセチルラクトサミンと脂肪族アルコールまたは単糖との縮合反応を示す薄層クロマトグラフィーである。

発明を実施するための最良の形態

20 本発明は、β 1, 4 グルコシル結合切断活性を有する酵素の存在下、次式：



25 で表わされる転移反応を用いることを特徴とする、ラクトシル配糖体またはN-アセチルラクトサミニル配糖体の製造方法である。

(酵素)

本発明に用いられる酵素は、 β 1, 4 グルコシル結合切断活性を有する酵素であれば、特に制限がない。エンド型の酵素でもよく、エキソ型の酵素でもよい。好ましい酵素としては、エキソーセロビオヒドロラーゼ、 β -D-グルコシダーゼ、セルラーゼなどが挙げられる。これらの酵素は、単独で用いてもよく、混合して用いてもよい。

酵素は、市販の β 1, 4 グルコシル結合切断活性を有する酵素であってもよく、 β 1, 4 グルコシル結合切断活性を有する酵素を生産する微生物、その培養液あるいは抽出物、あるいは精製物であってもよい。 β 1, 4 グルコシル結合切断活性を有する酵素を生産する微生物は、公知である。

細菌の例としては、例えば、バシラス (Bacillus) 属、セルビブリオ (Cellvibrio) 属、セルロモナス (Cellulomonas) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、スポロサイトファーガ (Sporocytophaga) 属、アセティビブリオ (Acetivibrio) 属、クロストリジウム (Clostridium) 属、バクテリオイド (Bacterioides) 属、トレボネマ (Treponema) 属、ルミノコッカス (Ruminococcus) 属などが挙げられる。

糸状菌の例としては、例えば、フミコーラ (Humicola) 属、トリコデルマ (Tricoderma) 属、マイロセシウム (Myrothecium) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、イルペクス (Irpeex) 属、ペニシリウム (Penicillium) 属、ペリクラリラ (Pellicularia) 属などに属する微生物が挙げられる。

放線菌の例としては、ストレプトマイセス (Streptomyces) 属、サーモノスポラ (Thermonospola) 属に属する微生物が挙げられる。

(供与体)

一般式 $LacA-X$ で表されるラクトースまたはN-アセチルラクト

サミン供与体としては、ラクトース又はN-アセチルラクトサミン（Xが水素の場合）及び、ラクトース又はN-アセチルラクトサミンを含有する糖質、複合糖質、またはフェノール性化合物が挙げられる。

5 ラクトース供与体及び／又はN-アセチルラクトサミン供与体の糖質としては、ラクトースまたはN-アセチルラクトサミンが β -グルコシド結合したオリゴ糖が挙げられる。

10 ラクトース供与体及び／又は、N-アセチルラクトサミン供与体の複合糖質としては、ラクトース又はN-アセチルラクトサミンを末端に有する糖蛋白質、プロテオグリカン、糖脂質が挙げられる。糖脂質としては、スフィンゴ糖脂質が好ましく、スフィンゴ糖脂質の構成成分であるセラミドあるいはセラミド類縁体の末端にラクトースまたはN-アセチルラクトサミンを有するものが好ましく用いられる。

15 ラクトースまたはN-アセチルラクトサミン供与体のフェノール性化合物としては、特に制限がない。ラクトース又はN-アセチルラクトサミンを有するフェノールおよびその誘導体（例えば、パラニトロフェノール）、チロシンおよびその誘導体、サリチル酸およびその誘導体などが挙げられる。なお、LacA-XがラクトースまたはN-アセチルラクトサミンの場合には、受容体Yとの間で縮合反応が起こるが、これも本発明でいう転移反応に含まれるものである。

20

（受容体）

ラクトースまたはN-アセチルラクトサミンの受容体であるYとしては、水酸基、すなわち、アルコール性水酸基またはフェノール性水酸基を有する化合物が挙げられる。

25 ラクトースまたはN-アセチルラクトサミンの受容体であるアルコール性水酸基を有する化合物としては、例えば、脂肪族アルコール、アミノ酸、糖

質などが挙げられる。

脂肪族アルコールは脂肪族炭化水素の水素原子の1個または複数個を水酸基で置換したものであり、これらは、水酸基の結合している炭素に結合するアルキル基の数で一級アルコール、二級アルコール、三級アルコールに分類される。また、水酸基の結合数によって、一価アルコール、二価アルコール、多価アルコールとも分類される。

一級アルコールとしては、メタノール、エタノール、ブタノール、プロパノール、ヘキサノール（シス-3-ヘキサノール）、オクタノール、アリルアルコール、ゲラニオール、シトロネオールなどが挙げられる。

二級アルコールとしては、イソプロパノール、sec-ブタノールなどが挙げられる。

三級アルコールとしては、tert-ブチルアルコールなどが挙げられる。

一価アルコールとしては、上記メタノールなどが、二価アルコールとしてはエチレングリコールなどが、三価アルコールとしてはグリセロールなどが代表的なものである。

以上の物質の他に、メントール、サンタロールなどの環状構造を有する脂環族アルコールも脂肪族アルコールに含む。

また、アルコール性水酸基を有するアミノ酸としては、例えば、セリン、スレオニンなどが挙げられる。さらに、アルコール性水酸基を有するアミノ酸、例えば、セリン、スレオニン残基を含有するペプチドおよび蛋白質、あるいは後述のフェノール性水酸基を有するチロシンを含有するペプチドも本発明の受容体として用いられる。

また、アルコール性水酸基を有する糖質としては、グルコース、マンノースなどの単糖が挙げられる。オリゴ糖としては、マルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、サイクロデキストリン、ゲンチオオリゴ糖、ニゲロオリゴ糖などの澱粉関連のオリゴ糖、マルトオリゴシルスクロース、フラクトオリゴ糖、

パラチノース、ラクトスクロース、キシロシルフルクトシド、ラフィノース、スタキオースなどの砂糖関連のオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、ラクトスクロース、ラクチュロースなどの乳糖関連のオリゴ糖、キシロオリゴ糖、アガロオリゴ糖、キチン・キトサンオリゴ糖、マンノオリゴ糖、アルギン酸オリゴ糖などが挙げられる。また、糖蛋白質、糖脂質の構成成分となっている糖鎖もしくはその部分構造となる糖鎖などを挙げるができる。

フェノール性水酸基を有する化合物としては、フェノールおよびその誘導体、チロシンおよびその誘導体、サリチル酸およびその誘導体、ゲニステインなどの大豆イソフラボン類などが挙げられる。

その他、糖蛋白質やスフィンゴ糖脂質などの複合糖質、セラミドなどの複合脂質、フラボノールなどのフラボノイド類縁体が水酸基を有しており、受容体として用いることができる。

(ラクトシルまたはN-アセチルラクトサミニル転移反応)

ラクトシルまたはN-アセチルラクトサミニル転移反応には、特に制限はない。ラクトシルまたはN-アセチルラクトサミニル供与体と、 β -1, 4-グルコシル結合を切断する活性を有する酵素と、ラクトシルまたはN-アセチルラクトサミニル受容体とを適切な割合で混合し、反応させればよい。

転移反応におけるラクトシルまたはN-アセチルラクトサミニル供与体および受容体の濃度は、特に制限はなく、当業者が反応の効率などを考慮して適宜決定すればよい。

用いる酵素の濃度は、特に制限がない。基質の濃度、反応温度、反応時間などを考慮して、当業者が決定すればよい。例えば、予備試験を行って、用いる酵素量を決定することができる。

反応温度は特に制限はない。一般的には、用いる酵素の至適温度 $\pm 20^{\circ}\text{C}$ 程度の範囲で行われる。より好ましくは酵素の至適温度 $\pm 10^{\circ}\text{C}$ 程度の範囲

で行われる。

反応のpHも特に制限がなく、用いる酵素によっても異なるが、一般には用いる酵素の至適pH \pm 3程度の範囲で行われる。より好ましくは酵素の至適pH \pm 2程度の範囲で行われる。このようなpH調整には、当業者が用いる適切な緩衝液が用いられる。

なお、基質が水に溶解しにくい場合、基質を溶解して反応効率を高めるために少量の溶媒や界面活性剤を加えても良い。

実施例

以下、実施例によって本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

実施例 1

脂肪族アルコールを受容体とするラクトシル転移反応を行った。ラクトース供与体として、p-ニトロフェニル- β -D-ラクトシド（以下、Lac-pNPという）を用い、ラクトース受容体として、脂肪族アルコールであるエタノール、ブタノール、ヘキサノール、オクタノール、イソプロパノールおよびt-ブチルアルコールを用いた。酵素として、トリコデルマ・リーゼイ（*T. reesei*）由来のセルラーゼ（協和発酵製）を用いた。

10mg/mlの酵素溶液50 μ l（20mM酢酸緩衝液（pH5.0）に溶解）に、4.65mg/mlのLac-pNPを200 μ l、各種アルコールを120 μ l、0.2M酢酸緩衝液（pH5.5）を30 μ l加え、全量を400 μ lとした。酵素反応は40℃で行い、転移反応は経時的に薄層クロマトグラフィー（以下、TLCという：展開溶媒はクロロホルム：メタノール：水=60：35：8）で確認した。TLCはメルク社製のアルミニウムシートシリカゲル60/Kieselgur F254プレコートを用いた。

5 × 80 cm) にロードし、25%メタノール水溶液を溶媒として、流速1.0 ml/分で、10 ml ずつ、分画した。検出は、210 nm および 300 nm の UV 吸収、フェノールー硫酸法による発色 (485 nm) を測定することにより、行った。チューブ No. 34 ~ 44 の画分をプールし、エバポレートして乾固した。

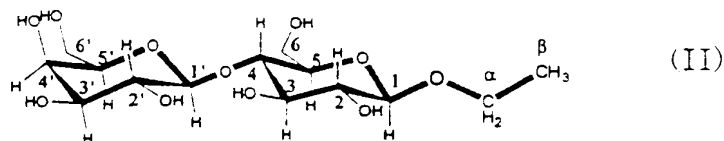
乾固物を 10 ml のクロロホルム：メタノール：水 = 50 : 45 : 10 に溶解し、ワコーゲル C-300 を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離・精製した。クロロホルム：メタノール：水 = 50 : 45 : 10 を展開溶媒とし、流速 2.0 ml/分で展開し、10 ml ずつ、分画した。検出は、210 nm および 300 nm の UV 吸収、フェノールー硫酸法による発色 (485 nm) を測定することにより、行った。チューブ No. 11 ~ 13 の画分をプールし、エバポレートして乾固した。

得られた乾固物の一部を 0.3 ml の蒸留水に溶解して、質量分析 FAB/MAS を行い、他方で、得られた乾固物の一部を重水に溶解して、¹H-NMR 分析を行った。¹H-NMR の結果を図 2 に、FAB/MAS の結果を図 3 に示す。また、図 2、3 に対応する ¹H-NMR および FAB/MAS のデータを以下に示す。

¹H-NMR (270 MHz, D₂O) : δ 4.50 (d, J 7.9 Hz, H-1), 4.45 (d, J 7.7 Hz, H-1'), 3.30 (dd, H-2), 1.24 (t, H-β) ;

FAB/MAS : (m/z)=371 (C₁₄H₂₆NO₁₁+H)⁺, (m/z)=393 (C₁₄H₂₆NO₁₁+Na)⁺.

これらのデータから、(1) の生成物が以下の構造式 (II) で示されるエチルラクトシドであることが確認された。



実施例 3

アルコール性水酸基を有するアミノ酸へのラクトシル転移反応を行った。酵素とラクトース供与体は、実施例 1 と同じものを使用した。反応液として、酵素を 0.5 mg、Lac-pNP を 0.94 mg、セリンを 50 mg またはスレオニンを 15 mg 含む、15 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 400 μ l を調製し、40°C、24 時間反応させた。反応後、実施例 1 と同様に TLC を用いて分析した。結果を図 4 に示す。なお、展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水 = 50 : 45 : 10 であった。

図 4 において、R は Lac と Lac-pNP の混合液、S は反応液、B はブランクを示す。(7) はセリン、(8) はスレオニンを受容体としたときの結果である。(7) および (8) の反応液において、基質 Lac-pNP は消滅し、それぞれ、セリルラクトシドとスレオニルラクトシドとが生じていた。なお、セリルラクトシドとスレオニルラクトシドの R_f 値はそれぞれ、0.27、0.29 であり、ラクトースの R_f 値 (0.34) と近いために、セリルラクトシドとスレオニルラクトシドはラクトースから明確に分離されず、ブロードなバンドとして表れた。

実施例 4

アルコール性水酸基を有する単糖へのラクトシル転移反応を行った。酵素とラクトース供与体は、実施例 1 と同じものを使用した。反応液として、酵素を 0.5 mg、Lac-pNP を 0.94 mg、グルコースまたはマンノースをそれぞれ 70 mg 含む、15 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 400 μ l を調製し、40°C、24 時間反応させた。反応後、実施例 1 と同様に TLC を用いて分析した。結果を図 5 に示す。なお、展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水 = 50 : 45 : 10 であった。

図 5 において、R は Lac と Lac-pNP の混合液、S は反応液、B は

ブランクを示す。(9)はグルコース、(10)はマンノースを受容体としたときの結果である。(9)および(10)の反応液において、基質L a c - p N Pは消滅し、それぞれ、グルコシルラクトシドとマンノシルラクトシドとが生じていた。グルコシルラクトシドとマンノシルラクトシドのR f 値はそれぞれ、
5 0. 2 4、0. 2 5であり、ラクトース(L a c)のR f 値(0. 3 4)よりも小さいR f 値を有しており、ラクトースから明確に分離された。

なお、図5において、L a c - p N PとL a cの間にバンドがあるが、(9)はグルコース(G l u)、(10)はマンノース(M a n)であった。

10 実施例5

アルコール性水酸基を有する脂環族アルコールであるL-メントールへのラクトシル転移反応を行った。酵素とラクトース供与体は、実施例1と同じものを使用した。反応液として、酵素を1 m g、L a c - p N Pを1 m g、L-メントールを5 m g、および界面活性剤として、コール酸を2重量%含む、15 m M酢酸緩衝液(p H 5. 0) 400 μ lを調製し、40℃、24
15 時間反応させた。反応後、実施例1と同様にT L Cを用いて分析した。結果を図6に示す。なお、展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水=65：35：4であった。

図6において、RはL a cとL a c - p N Pの混合液、Sは反応液、Bは
20 ブランクを示す。基質L a c - p N Pは消滅し、L-メントリルラクトシド(L a c - メントール)が生じており(R f 値0. 6 2)、ラクトース(R f 値0. 1 3)と区別された。L-メントリルラクトシド以外のスポットは、R f 値0. 8 1のコール酸以外は、なんらかの反応生成物と考えられる。

25 実施例6

アルコール性水酸基を有する脂肪族アルコールへのN-アセチルラクトサ

ミニル転移反応を行った。

N-アセチルラクトサミン供与体として、p-ニトロフェニル-β-N-アセチルラクトサミン（以下、LacNAc-pNPという）を用いた。反応液として、0.94mg、N-アセチルラクトサミン（以下、LacNAcという）受容体として、メタノール、エタノール、プロパノールをそれぞれ120μl、酵素として、トリコデルマ・リーゼイ（*T. reesei*）由来のセルラーゼ（協和発酵製）を0.5mgを含む400μlの15mM酢酸緩衝液（pH5.0）を調製し、40℃、24時間反応させた。反応後、実施例1と同様にTLCを用いて分析した。結果を図7に示す。なお、展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水=50：40：50であった。

図7において、RはLacNAcおよびLacNAc-pNPを、Bはブランクを示す。基質LacNAc-pNP（Rf=0.56）は消滅し、LacNAc（Rf値=0.30）、および矢印で示されるRf値=0.38、0.46および0.56の新しいスポットが表れ、それぞれ、メチルN-アセチルラクトサミニド（1）、エチルN-アセチルラクトサミニド（2）およびプロピルN-アセチルラクトサミニド（3）に対応していた。このうち、エチルN-アセチルラクトサミニド（2）については、標品（Carbiochem製）とTLCのスポットが一致した。

実施例7

アルコール性水酸基を有する脂肪族アルコール、糖類を受容体とするラクトシル転移（ラクトースの縮合）反応をおこなった。供与体としてラクトースを用いた。また、受容体としてメタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ヘキサノール、オクタノール、ドデカノール、アリルアルコール、マンノースを用いた。

ラクトース100mg、各受容体170μl（マンノースの場合は75m

g)、酵素としてトリコデルマ・リーゼイ (T. reesei) 由来のセルラーゼ (協和発酵製) を 25 mg 含む 650 μ l の 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を調製し、40℃、48時間反応させた。反応後、TLCで分析した。結果を図8(1)～(7)に示す。図中、Sは反応液、Bはブランクを示す。また、展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水=60：35：8である。

各反応液とも複数のスポットが認められたがラクトース (Lac) の Rf 値=0.29に対して、矢印で示す Rf 値=0.45、0.52、0.54、0.62、0.65、0.68、0.69の新しいスポットが見出された。それぞれのスポットから、メチルラクトシド(1)、エチルラクトシド(2)、プロピルラクトシド(3)、ブチルラクトシド(4)、ヘキシルラクトシド(5)、オクチルラクトシド(6)、ドデシルラクトシド(7)の生成が示唆された。

また、ラクトースの Rf 値=0.36に対して、Rf 値=0.53、0.29 (展開溶媒としてクロロホルム：メタノール：水=50：45：10)の新しいスポットが見出され (図8(8)～(9))、それぞれアリルラクトシド(8)、マンノシルラクトシド(9)の生成が示唆された。以下、それぞれの生成物を確認した。

7-1. エチルラクトシド(2)

エチルラクトシド(2)のTLCのスポットは、実施例1におけるLac-pNPとエタノールとの転移反応生成物及び標品(シグマ社製)と一致した。また、実施例2と同様に分離精製後、得られた乾燥物の一部をFAB/MAS、¹H-NMR、および¹³C-NMRにて分析した結果を以下に示す。

FAB/MAS : (m/z)=371 (C₁₄H₂₆NO₁₁+H)⁺、(m/z)=393 (C₁₄H₂₆NO₁₁+Na)⁺ ;

¹H-NMR (270 MHz、D₂O) : δ 4.50 (d, J 7.9 Hz, H-1), 4.45

(d, J 7.7Hz, H-1'), 3.30 (dd, H-2), 1.24 (t, H- β);

^{13}C -NMR (270 MHz, D_2O) : 17.1 (C- β), 62.9 (C-6), 63.8 (C-6'), 69.0 (C-4'), 71.4 (C- α), 73.8 (C-2'), 75.4 (C-3'), 75.6 (C-2), 77.3 (C-3), 77.6 (C-5), 78.2 (C-5'), 81.3 (C-4), 104.5 (C-1), 105.7 (C-1').

以上から、生成物(2)は構造式(II)に示すエチルラクトシドであることが確認された。

7-2 ブチルラクトシド(4)、ヘキシルラクトシド(5)、オクチルラク
トシド(6)

ブチルラクトシド(4)、ヘキシルラクトシド(5)、オクチルラクトシド(6)についても実施例1で得られた、Lac-pNPと対応する脂肪族アルコールにおける転移反応生成物とTLCのスポットが一致した。

更に、オクチルラクトシド(6)を含むと思われる反応液を前出のシリカゲルカラム($\phi 2 \times 50 \text{ cm}$)にかけ、溶離液として、クロロホルム：メタノール：水=60：25：4を用い、流速2.0 ml/分で溶出した。10 ml/フラクションで分画を行い、反応生成物をフェノール-硫酸法による発色(485 nm)で検出した。フラクションNo. 21~28を回収し、凍結乾燥して反応生成物約5 mgを得た。本品の純度はTLC、及び液体クロマトグラフィーにより99%以上であることを確認した。

得られた乾燥物の一部をFAB/MASにて、他方を ^1H -NMR、 ^{13}C -NMRにて分析した。結果を以下に示す。

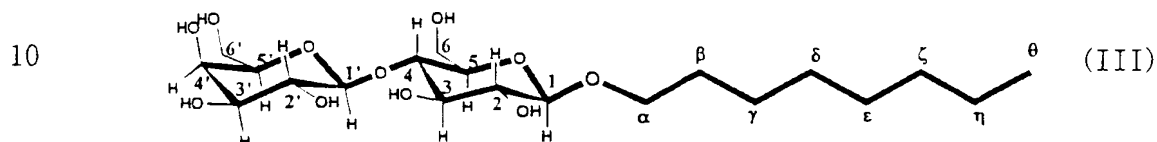
FAB/MAS : (m/z)=455 ($\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{NO}_{11} + \text{H}$) $^+$ 、(m/z)=477 ($\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{NO}_{11} + \text{Na}$) $^+$;

^1H -NMR (270 MHz, D_2O) : δ 4.48 (d, J 8.0Hz, H-1), 4.45 (d, J 7.7Hz, H-1'), 3.31 (dd, H-2), 1.63 (m, H- β), 1.36 (m, H- γ), 1.29

(m, H- δ - η), 0.87(t, H- θ);

^{13}C -NMR (270 MHz, D_2O) : 16.2 (C- θ), 24.8 (C- η), 27.8 (C- γ), 31.2 (C- δ), 31.2 (C- ϵ), 31.5 (C- β), 33.9 (C- ζ), 63.0 (C-6), 63.8 (C-6'), 71.4 (C-4'), 73.6 (C- α), 73.8 (C-2'), 75.4 (C-3'), 75.7 (C-2), 77.3 (C-3), 77.6 (C-5), 78.2 (C-5'), 81.3 (C-4), 104.8 (C-1), 105.7 (C-1')。

以上より、生成物(6)は、以下の構造式(III)で示されるオクチラクトシドであることが確認された。



7-3 ドデシルラクトシド (7)

15 さらに、ドデシルラクトシド(7)を含むと思われる反応液を、Chromatorex-ODS DM1020Tを用いたODSカラム($\phi 3.5 \times 60 \text{ cm}$)にかけた。カラムの5倍量の65%メタノールで洗浄後、75%メタノール(流速2.5 ml/分)で溶出した。30 ml/フラクションで分画を行い、反応生成物をフェノール-硫酸法による発色(485 nm)で検出した。フラクションN

20 o. 17~23を回収し、凍結乾燥して反応生成物約5 mgを得た。本品の純度はTLC、及び液体クロマトグラフィーにより99%以上であることを確認した。

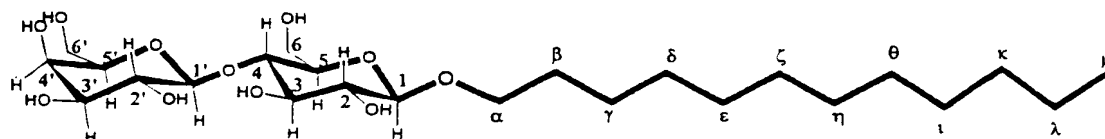
得られた乾燥物の一部をFAB/MASにて、他方を ^1H -NMR、 ^{13}C -NMRにて分析した。結果を以下に示す。

25 FAB/MAS : $(m/z)=511 (\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{NO}_{11} + \text{H})^+$, $(m/z)=533 (\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{NO}_{11} + \text{Na})^+$;

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, D_2O) : δ 4.23 (d, J 8.0 Hz, H-1) 、 4.45 (d, J 7.3 Hz, H-1') 、 3.19 (dd, H-2) 、 1.57 (m, H- β)、 1.33 (m, H- γ)、 1.24 (m, H- $\delta \sim \lambda$) 、 0.85 (t, H- μ) ;

$^{13}\text{C-NMR}$ (270 MHz, D_2O) : 14.4 (C- μ)、 23.7 (C- λ)、 27.1 (C- γ)、 30.5 (C- δ)、 30.5 (C- ϵ)、 30.6 (C- β)、 30.8 (C- ζ)、 30.8 (C- η)、 30.8 (C- θ)、 30.8 (C- τ)、 33.1 (C- κ)、 61.9 (C-6)、 62.5 (C-6')、 70.3 (C-4')、 71.0 (C- α)、 72.6 (C-2')、 74.8 (C-3')、 74.8 (C-2)、 76.4 (C-3)、 76.5 (C-5)、 77.1 (C-5')、 80.7 (C-4)、 104.3 (C-1)、 105.1 (C-1')。

以上より、生成物 (7) は、以下の構造式 (IV) で示されるドデシルラクトシド (7) であることが確認された。



(IV)

7-4 マンノシルラクトシド (8)

また、マンノシルラクトシド (8) については、実施例 4 で得られた転移生成物のマンノシルラクトシドと TLC のスポットが一致した。

(実施例 8)

アルコール性水酸基を有する脂肪族アルコール、糖類への N-アセチルラクトサミニル転移 (N-アセチルラクトサミンの縮合) 反応を行った。

供与体として N-アセチルラクトサミン (LacNAc) を用い、受容体

としてメタノール、エタノール、プロパノール、マンノースを用いて、実施例7と同条件で反応を行った。図9に結果を示す。図中、Sは反応液を、Bはブランクをそれぞれ表す。各反応液とも複数のスポットが認められたが、L a c N A c の R f 値 = 0. 24 に対して、矢印で示す、R f 値 = 0. 36、0. 40、0. 45 (展開溶媒としてクロロホルム：メタノール：水 = 60 : 35 : 8) の新しいスポットにより、それぞれメチルN-アセチルラクトサミニド (1)、エチルN-アセチルラクトサミニド (2)、プロピルN-アセチルラクトサミニド (3) の生成が示唆された (図9 (1) ~ (3))。

また、L a c N A c の R f 値 = 0. 58 に対して、R f 値 = 0. 3 (展開溶媒としてクロロホルム：メタノール：水 = 50 : 45 : 10) の新しいスポットにより、マンノシルN-アセチルラクトサミニド (4) の生成が示唆された (図9 (4))。

8-1 エチルN-アセチルラクトサミニド (2) の構造確認

エチルN-アセチルラクトサミニド (2) を含むと思われる反応液を前出のシリカゲルカラム ($\phi 2 \times 40$ cm) にかけて、溶離液として、クロロホルム：メタノール：水 = 50 : 45 : 10 を用い、流速 2. 0 ml / 分で溶出した。5 ml / フラクションで分画を行い、反応生成物をフェノール-硫酸法による発色 (485 nm) で検出した。フラクション No. 11 ~ 14 を回収し、凍結乾燥して反応生成物約 5 mg を得た。本品の純度は TLC、及び液体クロマトグラフィーにより 99% 以上であることを確認した。

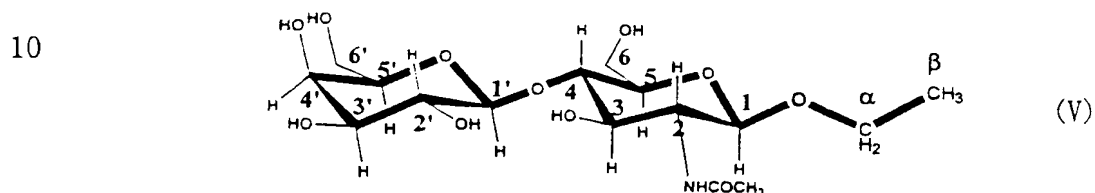
得られた乾燥物の一部を FAB / MAS にて、他方を ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR にて分析した。結果を以下に示す。

FAB / MAS : $(m/z) = 411$ ($\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_{11} + \text{H}$) $^+$ 、 $(m/z) = 433$ ($\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}_{11} + \text{Na}$) $^+$;

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, D_2O) : δ 4.53 (d, J 5.6 Hz, H-1), 4.45 (d, J 7.9 Hz, H-1'), 2.02 (s, COCH_3), 1.24 (t, H- β);

$^{13}\text{C-NMR}$ (270 MHz, D_2O) : δ 17.1 (C- β), 24.9 (NHCOCH_3), 57.9 (C-2), 62.9 (C-6), 63.8 (C-6'), 69.1 (C-4'), 71.4 (C- α), 73.8 (C-2'), 74.9 (C-3'), 75.3 (C-3), 77.6 (C-5'), 78.2 (C-5), 81.3 (C-4), 103.4 (C-1), 105.7 (C-1'), 177.6 (NHCOCH_3).

以上より、生成物は以下の構造式 (V) で示されるエチルN-アセチルラクトサミニドであることが確認された。



8-2 マンノシルN-アセチルラクトサミニド (4) の構造確認

15 マンノシルN-アセチルラクトサミニド (4) を含むと思われる反応物をクロマトグラフ用活性炭素 (和光純薬製) を用いた活性炭カラム (ϕ 2.5 \times 25 cm) にかき、水/エタノール溶液のリニアグラジエント (0 \rightarrow 30%; 2 L) により、流速 1.5 ml/分で溶出した。15 ml/フラクションで分画を行い、反応生成物をフェノール-硫酸法による発色 (485 nm)

20 (m) で検出した。フラクション No. 80 ~ 102 を回収し、凍結乾燥して反応生成物約 5 mg を得た。本品の純度は TLC、及び液体クロマトグラフィーにより 99% 以上であることを確認した。

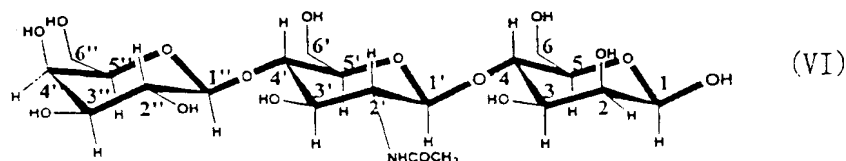
得られた乾燥物の一部を FAB/MAS にて、他方を $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ にて分析した。結果を以下に示す。

25 FAB/MAS : (m/z) = 546 ($\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{NO}_{11} + \text{H}$) $^+$, (m/z) = 568 ($\text{C}_{24}\text{H}_{46}\text{NO}_{11} + \text{Na}$) $^+$;

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz、 CD_3OD) : δ 5.16 (d, J 1.6 Hz, H-1 α)、4.89 (s, H-1 β)、4.58 (d, J 8.3 Hz, H-1')、4.47 (d, J 7.6 Hz, H-1'')、(dd, H-2) ;

$^{13}\text{C-NMR}$ (270 MHz、 D_2O) : 24.9 (NHCOCH_3)、58.0 (C-2')、63.2 (C-6')、62.8 (C-6 α)、62.8 (C-6 β)、63.8 (C-6'')、71.4 (C-4'')、71.8 (C-2 α)、73.0 (C-3 α)、73.5 (C-5 α)、73.5 (C-2 β)、73.8 (C-2'')、74.6 (C-3 β)、74.9 (C-3'')、75.3 (C-3')、77.5 (C-5 β)、77.6 (C-5'')、78.2 (C-5')、79.8 (C-4 β)、80.3 (C-4 α)、81.1 (C-4')、96.4 (C-1 β)、96.5 (C-1 α)、104.2 (C-1')、105.7 (C-1'')、177.6 (NHCOCH_3)。

以上より、生成物は以下の構造式(VI)で示されるマンノシルN-アセチラクトサミニドであることが確認された。



実施例 7 および 8 の結果は、 β -1.4 グルコシド結合を切断する酵素の存在下、ラクトース及びN-アセチラクトサミン自体がアルコール性水酸基を有する化合物と縮合し、対応する配糖体が生成することを示している。

(実施例 9)

100 mg/ml の酵素溶液 5.6 ml に 1 g のN-アセチラクトサミン (LacNAc)、4.2 ml のグリセロール、1.4 ml の酢酸エチルを加え、酢酸カルシウムで pH を 7.0 に調整し、40℃で48時間反応を行った。

反応液をアニリン酢酸処理し、 LacNAc を除去した後、この反応液を前出のものと同じ単体を用いた活性炭カラム ($\phi 5 \times 50 \text{ cm}$) にロードし

て、流速 5 ml / 分で吸着物を溶出させた。展開溶媒として、水 / メタノール溶液（リニアグラジエント、0 → 20 % ; 6 L）を用いた。50 ml / フラクションで分画を行い、反応生成物をフェノール-硫酸法による発色（485 nm）で検出した。フラクション No. 115 ~ 125 を回収し、凍結乾燥して反応生成物である乾燥物を約 10 mg 得た。本品の純度は TLC、及び液体クロマトグラフィーにより 99 % 以上であることを確認した。

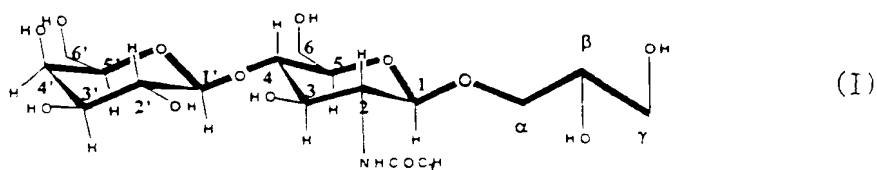
得られた乾燥物の一部を FAB / MAS にて、他方を ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR にて分析した。結果を以下に示す。

FAB / MAS : $(m/z) = 458$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{NO}_{13} + \text{H}$) $^+$ 、 $(m/z) = 607$ ($\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{NO}_{13} + \text{Triethanolamine}$) $^+$;

^1H -NMR (270 MHz、 D_2O) : δ 4.55 (d, J 7.3 Hz, H-1)、4.47 (d, J 6.8 Hz, H-1')、2.04 (s, COCH_3) ;

^{13}C -NMR (270 MHz、 D_2O) : δ 25.0 (NHCOCH_3)、57.9 (C-2)、62.9 (C-6)、63.9 (C-6')、65.2 (C- γ)、71.4 (C-4')、73.1 (C- β)、73.5 (C- α)、73.8 (C-2')、75.2 (C-3')、75.4 (C-3)、77.6 (C-5')、78.2 (C-5)、81.3 (C-4)、104.2 (C-1)、105.7 (C-1')、177.6 (NHCOCH_3)。

以上より、生成物は以下の構造式(I)で示される、O- β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-2-Acetylamino-2-deoxyl-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 1)-Glycerin であることが判明した。



得られた化合物は、従来報告された化合物とは、ガラクトースと N-アセチルグルコサミンの結合様式並びに N-アセチルグルコサミンとグリセロール

ルの結合様式において異なる新規物質である。

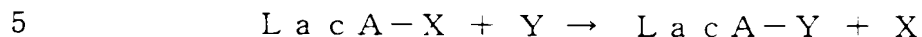
- 5 本発明において、グリセロールにN-アセチルラクトサミンが付加した新規配糖体を得られたことにより、従来のグリセロールをアグリコンとする配糖体が呈する公知の物性、及び生理学的機能は勿論のこと、全く新規の機能が期待でき、グリセロ糖脂質等の有用物質の新たな骨格（原料）物質としても活用できる。

産業上の利用可能性

- 10 本発明により、食品、機能性食品素材、医薬品および試薬として有用なラクトシル配糖体およびN-アセチルラクトサミニル配糖体が、温和な条件で、しかも高収率で大量に製造され、安価に供給することが可能となる。また、本発明によるラクトシル配糖体およびN-アセチルラクトサミニル配糖体は、医学、生化学の研究に貢献するものである。

請 求 の 範 囲

1. β 1, 4 グルコシル結合切断活性を有する酵素の存在下、次式：



（式中、Lac AはラクトースまたはN-アセチルラクトサミンを、Xは水素（H）、糖質、複合糖質、またはフェノール性化合物を、Yはアルコール性水酸基またはフェノール性水酸基を有する化合物をそれぞれ表す。）で表わされる転移反応を用いることを特徴とする、ラクトシル配糖体またはN-アセチルラクトサミニル配糖体の製造方法。

10

2. 前記Yがアルコール性水酸基を有する化合物である、請求項1に記載の製造方法。

15

3. 前記アルコール性水酸基を有する化合物が、脂肪族アルコールまたは糖質である、請求項2に記載の製造方法。

4. 前記アルコール性水酸基を有する化合物が、セリンまたはスレオニン残基を有するアミノ酸、ペプチドまたは蛋白質である、請求項2に記載の製造方法。

20

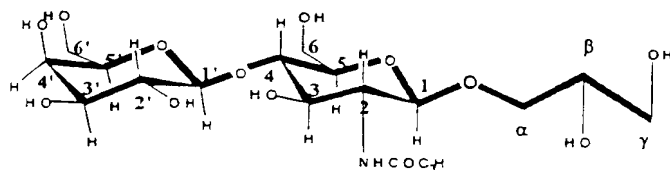
5. Xが水素である、請求項1ないし4のいずれかの項に記載の製造方法。

6. 前記 β - 1, 4 グルコシル結合を切断する活性を有する酵素が、エキソ-セロビオヒドロラーゼ、 β - D-グルコシダーゼ、および/またはセルラ

25

一ゼである、請求項 1 ないし 5 のいずれかの項に記載の製造方法。

7. 以下の構造式 (I) で示される、グリセリルN-アセチルラクトサミニ
ド (0- β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-0- β -D-2-Acetylamino-2-deoxyl-Glu
copyranosyl-(1 \rightarrow 1)-Glycerin) 。



(I)



.

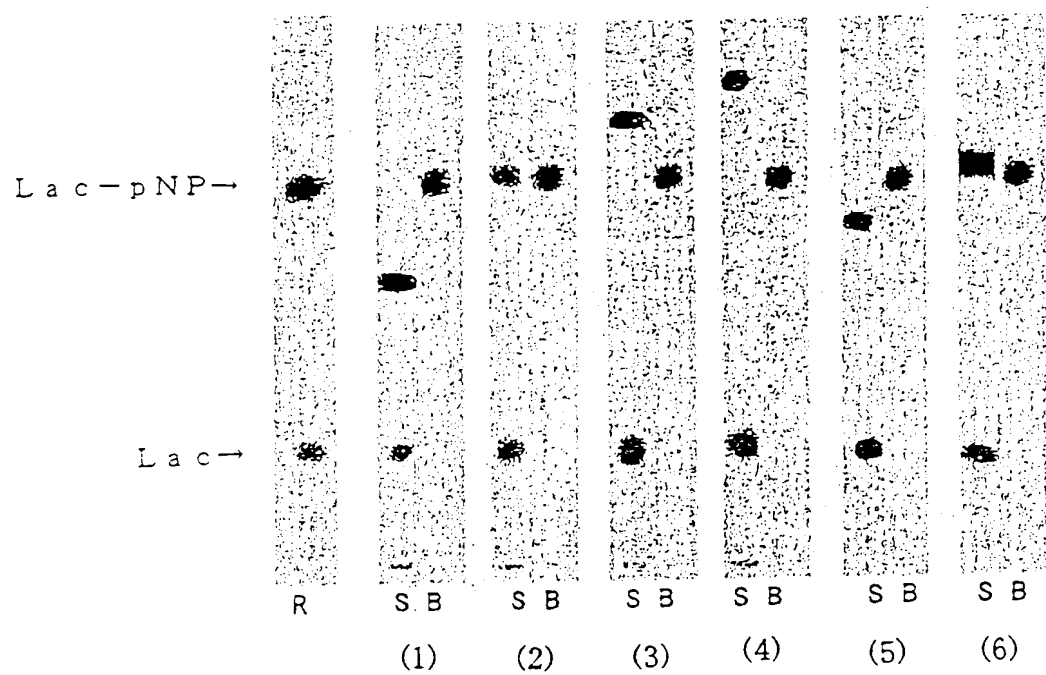
.

.

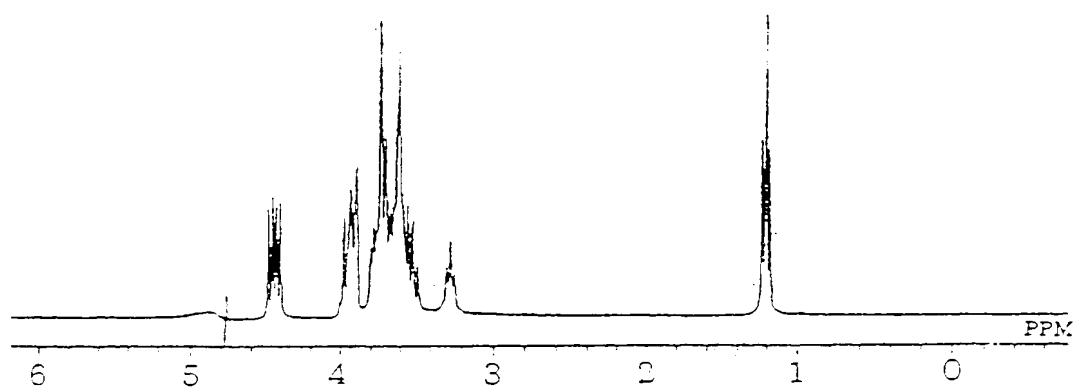
.

1 / 5

第1図



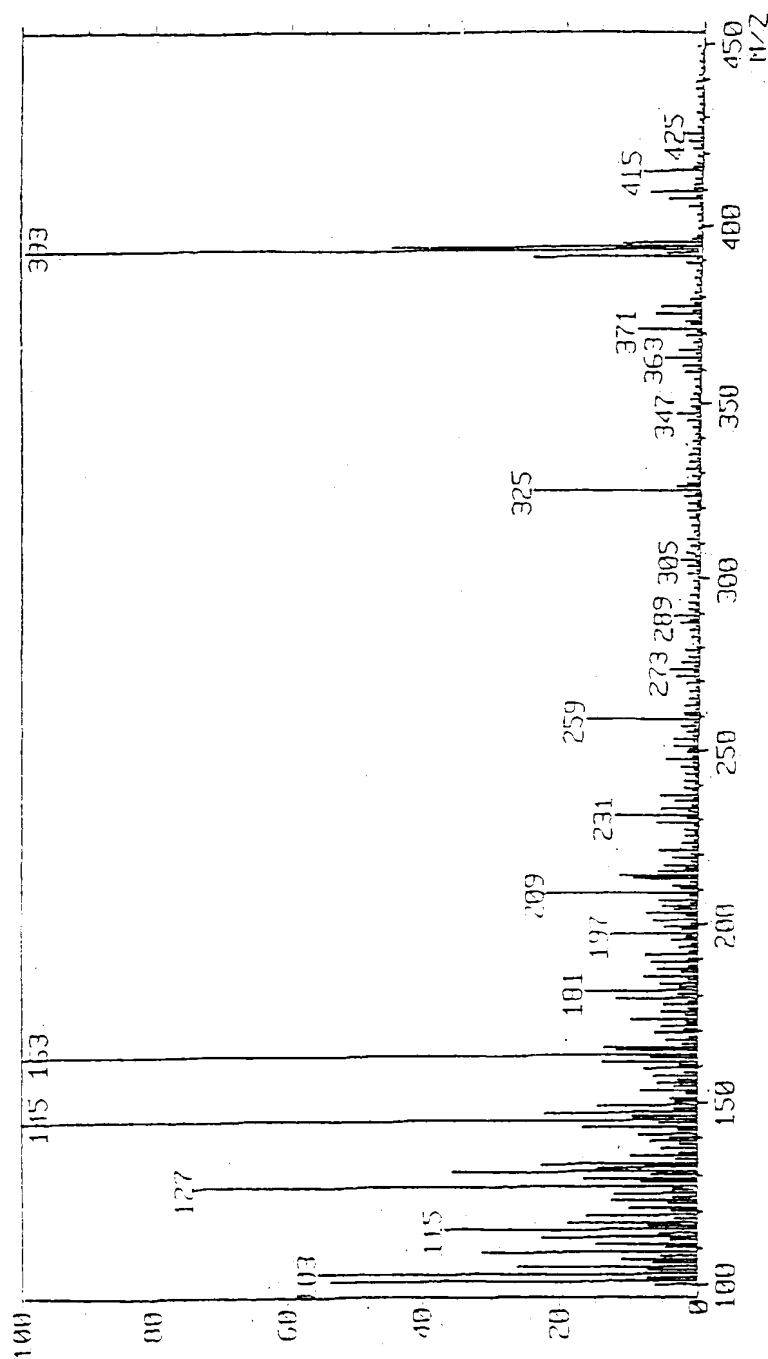
第2図





2 / 5

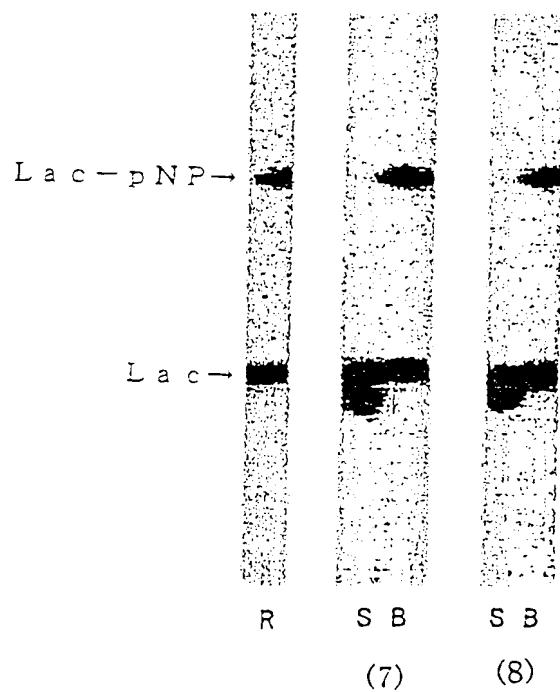
第3図



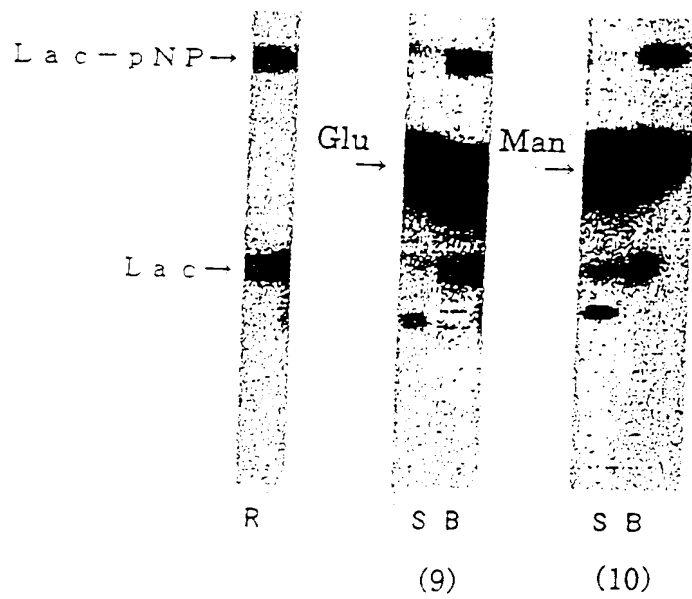


3 / 5

第4図



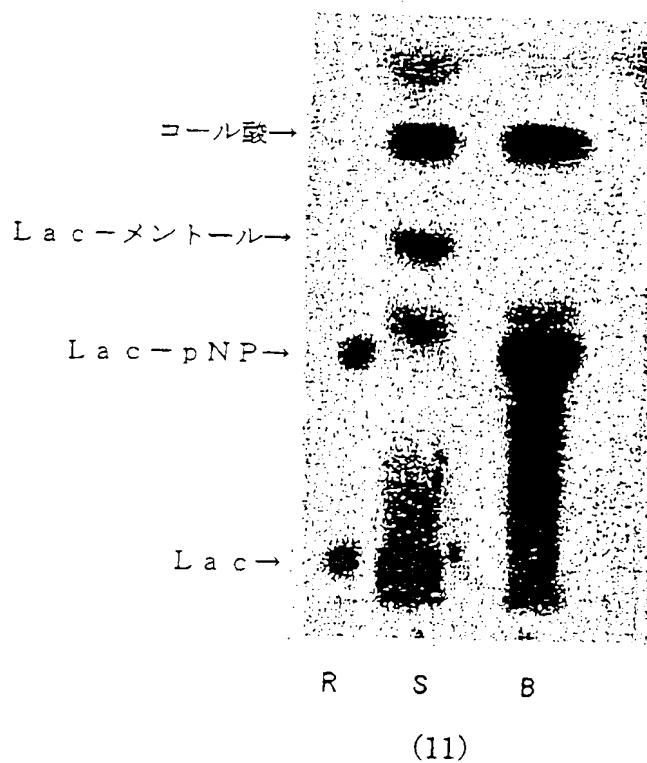
第5図



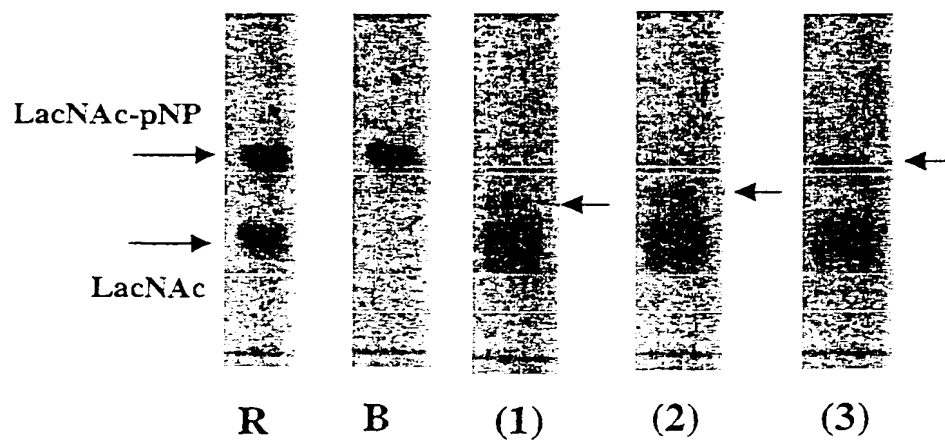


4 / 5

第6図



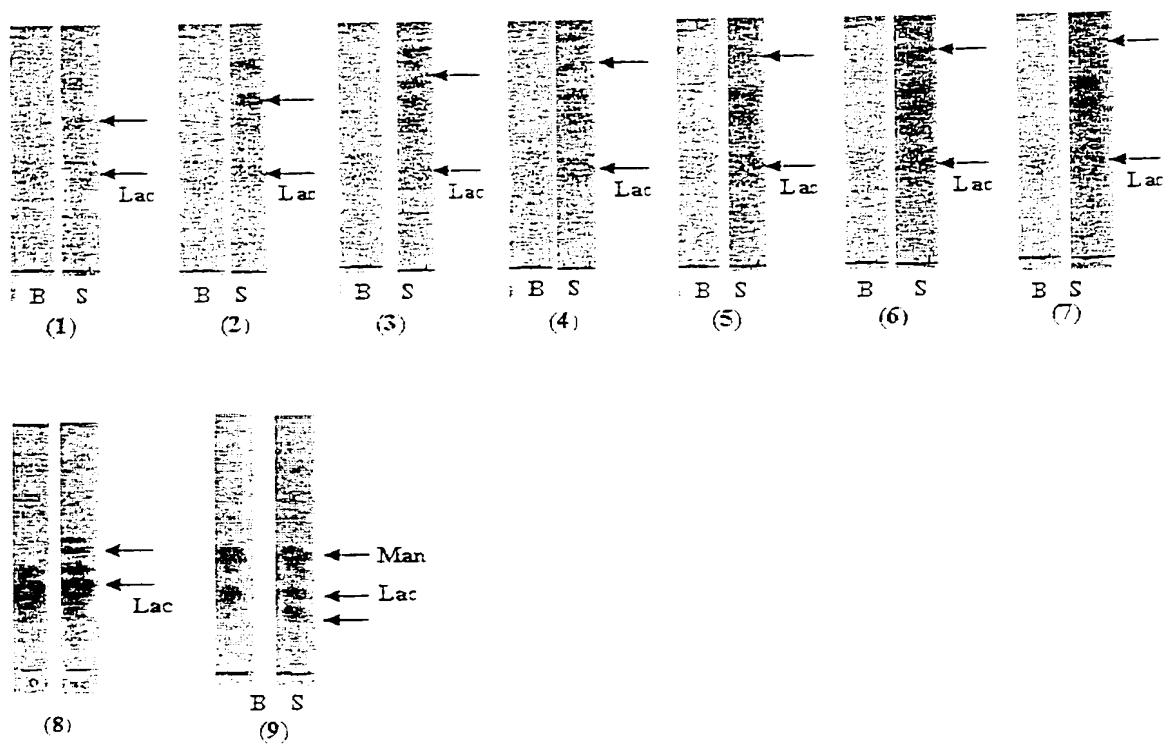
第7図



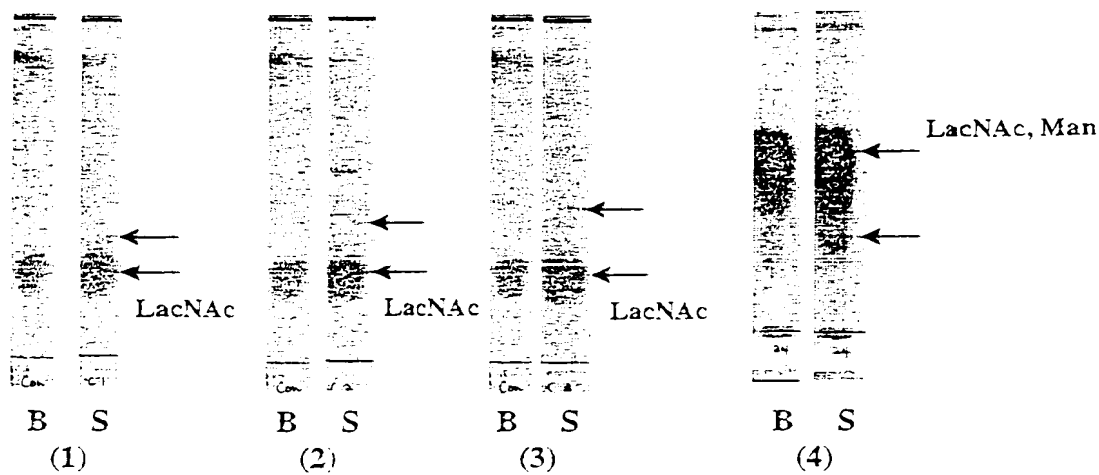


5 / 5

第8図



第9図





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05576

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12P19/14, C07H15/04, C07H3/06, C07H15/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12P19/00-19/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG),
BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 59-82096, A (Toyobo Co., Ltd.), 11 May, 1984 (11.05.84) (Family: none)	1, 2, 6
Y	JP, 10-66595, A (UNITIKA Ltd.), 10 March, 1998 (10.03.98) (Family: none)	1-6
Y	EP, 456986, A (SUNTORY LTD.), 21 November, 1991 (21.11.91) & JP, 3-277276, A & CA, 2038352, A & US, 5153128, A	1-6
Y A	JP, 2-69192, A (Kao Corporation), 08 March, 1990 (08.03.90) (Family: none)	1-6 7
A	JP, 2-242692, A (Kao Corporation), 27 September, 1990 (27.09.90) (Family: none)	1-7
A	FR, 2640997, A (AJINOMOTO KK), 29 June, 1990 (29.06.90) & JP, 3-35787, A & US, 5149640, A	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 November, 2000 (10.11.00)Date of mailing of the international search report
21 November, 2000 (21.11.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/05576

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12P19/14, C07H15/04, C07H3/06, C07H15/08

B. 調査を行った分野
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12P19/00-19/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI (DIALOG)、
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 59-82096, A (東洋紡績株式会社) 11.5月.1984 (11.05.84) ファミリーなし	1, 2, 6
Y	JP, 10-66595, A (ユニチカ株式会社) 10.3月.1998 (10.03.98) ファミリーなし	1-6
Y	EP, 456986, A (SUNTORY LTD.) 21.11月.1991 (21.11.91) & JP, 3-277276, A & CA, 2038352, A & US, 5153128, A	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
10.11.00

国際調査報告の発送日
21.11.00

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
甲斐 順子

4N 9641

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	JP, 2-69192, A (花王株式会社) 8. 3月. 1990 (08. 03. 90) ファミリーなし	<u>1-6</u> 7
A	JP, 2-242692, A (花王株式会社) 27. 9月. 1990 (27. 09. 90) ファミリーなし	1-7
A	FR, 2640997, A (AJINOMOTO KK) 29. 6月. 1990 (29. 06. 90) &JP, 3-35787, A &US, 5149640, A	1-7



(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

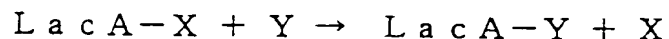
2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約:

β 1, 4 グルコシル結合切断活性を有する酵素の存在下、次式:



(式中、Lac AはラクトースまたはN-アセチルラクトサミンを、Xは水素(H)、糖質、複合糖質、またはフェノール性化合物を、Yはアルコール性水酸基またはフェノール性水酸基を有する化合物をそれぞれ表す。) で表わされる転移反応を用い、食品、機能性食品素材、医薬品および試薬として有用なラクトシル配糖体およびN-アセチルラクトサミニル配糖体を、高収率で、かつ、安価に供給する。



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05576

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12P19/14, C07H15/04, C07H3/06, C07H15/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12P19/00-19/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG),
BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 59-82096, A (Toyobo Co., Ltd.), 11 May, 1984 (11.05.84) (Family: none)	1, 2, 6
Y	JP, 10-66595, A (UNITIKA Ltd.), 10 March, 1998 (10.03.98) (Family: none)	1-6
Y	EP, 456986, A (SUNTORY LTD.), 21 November, 1991 (21.11.91) & JP, 3-277276, A & CA, 2038352, A & US, 5153128, A	1-6
Y	JP, 2-69192, A (Kao Corporation), 08 March, 1990 (08.03.90) (Family: none)	1-6
A		7
A	JP, 2-242692, A (Kao Corporation), 27 September, 1990 (27.09.90) (Family: none)	1-7
A	FR, 2640997, A (AJINOMOTO KK), 29 June, 1990 (29.06.90) & JP, 3-35787, A & US, 5149640, A	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 November, 2000 (10.11.00)Date of mailing of the international search report
21 November, 2000 (21.11.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 01 March 2001 (01.03.01)	
International application No.: PCT/JP00/05576	Applicant's or agent's file reference: P2-00S02152
International filing date: 18 August 2000 (18.08.00)	Priority date: 19 August 1999 (19.08.99)
Applicant: YASUTAKE, Nozomu et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

18 January 2001 (18.01.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

47

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P2-00S02152	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/05576	International filing date (<i>day month year</i>) 18 August 2000 (18.08.00)	Priority date (<i>day month year</i>) 19 August 1999 (19.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P 19/14, C07H 15/04, 3/06, 15/08		
Applicant SHOWA SANGYO CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 18 January 2001 (18.01.01)	Date of completion of this report 11 September 2001 (11.09.2001)
Name and mailing address of the IPEA JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No

PCT/JP00/05576

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and "01").

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP00/05576

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: JP, 59-82096, A (Toyobo Co., Ltd.), 11 May, 1984 (11.05.84)
 Document 2: JP, 10-66595, A (Unitika Ltd.), 10 March, 1998 (10.03.98)
 Document 3: EP, 456986, A (Suntory Ltd.), 21 November, 1991 (21.11.91)
 Document 4: JP, 2-69192, A (Kao Corp.), 8 March, 1990 (08.03.90)

Claims 1-7

The subject matters of claims 1-7 appear to be novel and to involve an inventive step in view of documents 1-4 respectively cited in the ISR.

Documents 1-4 do not describe that a glycoside containing a lactose unit is obtained since the lactose portion is transferred without being hydrolyzed in the presence of an enzyme having an activity of cleaving β 1,4 glycosyl bonds, and a person skilled in the art could not have easily conceived of this constitution from the descriptions of documents 1-4 either.



P C T

REC'D 28 SEP 2001

WIPO

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 P2-00S02152	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05576	国際出願日 (日.月.年) 18.08.00	優先日 (日.月.年) 19.08.99
国際特許分類 (IPC) Int.Cl ⁷ C12P19/14, C07H15/04, C07H3/06, C07H15/08		
出願人 (氏名又は名称) 昭和産業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 18.01.01	国際予備審査報告を作成した日 11.09.01		
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 木村 順子 印	4N	9641
電話番号 03-3581-1101 内線 3488			



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-7

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-7

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-7

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: JP 59-82096 A (東洋紡績株式会社) 11.5月.1984 (11.05.84)

文献2: JP 10-66595 A (ユニチカ株式会社) 10.3月.1998 (10.03.98)

文献3: EP 456986 A (SUNTORY LTD.) 21.11月.1991 (21.11.91)

文献4: JP 2-69192 A (花王株式会社) 8.3月.1990 (08.03.90)

請求の範囲 1-7

請求の範囲 1-7 に記載された発明は、国際調査報告に引用された文献 1-4 に対して、新規性及び進歩性を有する。

文献 1-4 には、 β 1, 4 グルコシル結合切断活性を有する酵素の存在下、ラクトース部分が加水分解を受けずに転移され、ラクトース単位を保ったままの配糖体が得られる旨は記載されておらず、しかも、その点は、文献 1-4 の記載から、当業者といえども容易に想到し得ないことである。



P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
[P C T 1 8 条、P C T 規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 P2-00S02152	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 5 5 7 6	国際出願日 (日.月.年) 1 8 . 0 8 . 0 0	優先日 (日.月.年) 1 9 . 0 8 . 9 9
出願人 (氏名又は名称) 昭和産業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(P C T 1 8 条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条(P C T 規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☒ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12P19/14, C07H15/04, C07H3/06, C07H15/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12P19/00-19/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI (DIALOG)、
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 59-82096, A (東洋紡績株式会社) 11. 5月. 1984 (11. 05. 84) ファミリーなし	1, 2, 6
Y	JP, 10-66595, A (ユニチカ株式会社) 10. 3月. 1998 (10. 03. 98) ファミリーなし	1-6
Y	EP, 456986, A (SUNTORY LTD.) 21. 11月. 1991 (21. 11. 91) & JP, 3-277276, A & CA, 2038352, A & US, 5153128, A	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 11. 00

国際調査報告の発送日

21.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

甲斐 順子

印

4N

9641

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	JP, 2-69192, A (花王株式会社) 8. 3月. 1990 (08. 03. 90) ファミリーなし	<u>1-6</u> 7
A	JP, 2-242692, A (花王株式会社) 27. 9月. 1990 (27. 09. 90) ファミリーなし	1-7
A	FR, 2640997, A (AJINOMOTO KK) 29. 6月. 1990 (29. 06. 90) &JP, 3-35787, A &US, 5149640, A	1-7



(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Publication number:

0 456 986 A1

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION(21) Application number: **91103967.5**(51) Int. Cl.⁵: **C12N 9/10, A23C 9/12,
C12P 19/04**(22) Date of filing: **14.03.91**(30) Priority: **16.03.90 JP 64318/90
17.09.90 JP 246792/90**(43) Date of publication of application:
21.11.91 Bulletin 91/47(84) Designated Contracting States:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE(71) Applicant: **SUNTORY LIMITED
1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku
Osaka-shi, Osaka 530(JP)**

(72) Inventor: **Nakayama, Toru
13-22, Ishibashi 2-chome
Ikeda-shi, Osaka 563(JP)**
Inventor: **Kodama, Yukiko
3-11, Higashi-Kanmaki 2-chome
Takatsuki-shi, Osaka 569(JP)**
Inventor: **Amano, Norihide
7-17, Kitasono-cho
Takatsuki-shi, Osaka 569(JP)**
Inventor: **Nakao, Masahiro
1-10, Himuro-cho 1-chome
Takatsuki-shi, Osaka 569(JP)**
Inventor: **Shibano, Yuji
5-23, Toneyama 4-chome
Toyonaka-shi, Osaka 560(JP)**
Inventor: **Amachi, Teruo
1-10, Hibarigaoka-yamate 2-chome
Takarazuka-shi, Hyogo 665(JP)**

(74) Representative: **Wächtershäuser, Günter, Dr.
Tal 29
W-8000 München 2(DE)**

(54) **Heat resistant beta-galactosyltransferase, its production process and its use.**

(57) Described herein are a novel heat-resistant β -galactosyltransferase, a production process of the enzyme and a utilization method of the enzyme. The enzyme is produced preferably by produced by a microorganism belonging to the family of *Actinomycetaceae*, which may be selected from fungi belonging to the genus *Saccharopolyspora*, the genus *Thermomonospora* or the genus *Thermoactinomyces*.

EP 0 456 986 A1



BACKGROUND OF THE INVENTION

1) Field of the Invention

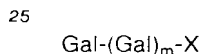
5 This invention relates to a novel heat-resistant β -galactosyltransferase, its production process and its use. More specifically, this invention is concerned with a novel β -galactosyltransferase produced by a microorganism belonging to the family of *Actinomycetaceae* -such as a microorganism belonging to the genus *Saccharopolyspora* - and having high heat stability, its production process and its use.

10 2) Description of the Related Art

Modification of a saccharide or glycoside by glycosylation is known to make it possible to impart new physiological activities or physical properties to the first-mentioned saccharide or glycoside (hereinafter simply called a "saccharide"). For example, such modification is known to enhance sweetness, to reduce or
 15 eliminate bitterness, to increase the water solubility of glycosides having low solubility in water (illustrative examples are found among active ingredients of Chinese herbal remedies and like ingredients), and/or to improve *in vivo* stability and intestinal absorption.

A function imparted as a result of glycosylation and its degree vary depending on the type of the glycosyl donor and also the nature of the saccharide so modified. There have however been many reports
 20 in which preferable results are obtained for the above-mentioned objects by modifying saccharides with galactosyl groups. Based on such reports, a variety of function oligosaccharides and function glycosides have been increasingly developed.

For example, among oligosaccharides or saccharide-modified glycosides represented by the following formula:



in which Gal means a galactosyl group, X denotes a saccharide or glycoside and m stands for an integer, oligosaccharides (galactooligosaccharides) in which X is a glucosyl group (Glu) and m is an integer of 0-4
 30 are known as proliferation promoting substances for *Bifidobacterium bifidum*, a benign intestinal bacterium (Japanese Patent Application Laid-Open "Kokai" No. SHO 55-104885). In addition, they are found to have a wide range of utility as food materials for their excellent sweetness intensity and quality, low cariogenicity, low calorific nature, high processing stability, good moisture retaining property, high water-activity lowering ability, good colorability, etc.

Further, galactosylation of sucrose provides galactosylsucrose of the above formula in which X is sucrose and m is 0 (Japanese Patent Application Laid-Open "Kokai" No. SHO 64-85090) whereas galactosylation of lactulose yields galactosyllactulose of the above formula in which X is lactulose and m is 0 (Japanese Patent Application Laid-Open "Kokai" No. SHO 63-94987). These modified saccharides are also found to have new functions as galactooligosaccharide has. In addition, as to the sweet glycoside
 40 rubsode, improvements to its sweetness intensity and quality have been achieved by galactosylation [Argic. Biol. Chem. **53**, 2923-2928 (1989)].

As has been described above, the transgalactosylation reaction by β -galactosidase is utilized to add one or more galactosyl groups or oligogalactosyl groups so that a galactosylated product can be produced.

This reaction has its basis on the fact that some β -galactosidases catalyze the β -D-transgalactosylation
 45 reaction to a saccharide (or a saccharide moiety of a glycoside) in the presence of β -galactopyranoside at a high concentration.

The levels of the ability of enzymes to transfer a β -galactosyl group vary widely depending on their sources. To make the reaction proceed efficiently, it has been necessary to use a β -galactosidase having high transgalactosylation activity.

50 Exemplary conventional β -galactosidases include the enzyme derived from the mold fungus, *Aspergillus oryzae* (Japanese Patent Publication "Kokoku" No. SHO 55-104885), and the enzymes derived from the bacteria, *Bacillus circulans* (Japanese Patent Publication "Kokoku" No. SHO 62-209780) and *Streptococcus thermophilus* [Food Chem. **10**, 195-204 (1983)]. Galactooligosaccharide is actually produced by causing these enzymes to act on lactose. Further, examples of yeast cells having β -galactosidase activities
 55 include *Lipomyces*, *Rhodotrula*, *Sirobasidium*, *Sterigmatomyces* (Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, **63**(3), 629 (1989)), *Sporoboromyces* (Japanese Patent Publication "Kokai" No. SHO 62-208293), *Cryptococcus* (Japanese Patent Publication "Kokai" Nos. SHO 60-251896, SHO 62-130695 and SHO 61-236790), and *Kluyveromyces* (Japanese Patent Publication "Kokai" No. SHO 61-271999). Produc-



tion of galactooligosaccharide making use of these yeast cells is also attempted.

Generally, as a donor of β -D-galactosyl groups, use of lactose is most advantageous from the industrial viewpoint. Lactose is contained abundantly in cow milk and is also produced as a dairy waste abundantly in a large volume outside Japan, so that its price is lowest as a raw material. Incidentally, based on the fact that the production of lactose-hydrolyzed milk making use of a β -galactosidase has already been practiced [Food Chemical, 7, 38-44 (1986)], a production process of processed galactooligosaccharide-containing milk, said process making use of a β -galactose having high transfer activity, has been reported recently (Japanese Patent Application Laid-Open "Kokai" No. HEI 1-168234).

In general, a glycosyl transfer reaction proceeds faster and more efficiency as the concentration of a galactosyl donor ("lactose" in the present specification) becomes higher. For this reason, it is desirable to make the concentration of lactose higher in the reaction mixture. However, a lactose solution of high concentration has high viscosity and tends to permit easy precipitation of crystals at room temperature, leading to the problem that its handling is difficult during the production steps.

It has hence been required to raise the temperature of the reaction system (for example, to 60°C or higher) so that precipitation of lactose can be suppressed and the viscosity can be lowered. It is advantageous from the standpoint of cost to increase the amount of the reactant (lactose or the like) to be charged per unit volume by increasing its solubility. Further, a chemical reaction proceeds faster as the temperature becomes higher. It is accordingly possible to increase the velocity of the enzyme reaction and hence to shorten the reaction time by raising the temperature of the reaction system. In addition, a higher reaction temperature makes saprophytes difficult to grow. Furthermore, it is also expected that bacteriostatic action takes place by the high osmotic pressure of the resulting high-concentration saccharide solution, said pressure having been achieved by the high temperature, and contributes to the prevention of saprophytic contamination during the production steps.

Although the transgalactosylation reaction at high temperatures has many advantages as has been described, the enzyme is required to have high heat stability in order to conduct the reaction at such a high temperature. Moreover, to advantageously use the above reaction in the industry, it is required to immobilize the enzyme and to make the reaction steps automatic and continuous so that the addition product can be mass produced and its production cost can be lowered.

A β -galactosidase can be stabilized by lactose of high concentration in general. Still higher heat resistance is however required to immobilize the enzyme and to use it repeatedly at high temperatures over a long period of time. The enzymes derived from the mold fungus, *Aspergillus oryzae*, the enzymes derived from the bacteria, *Bacillus circulans* and *Streptococcus thermophilus*, and yeast cells having β -galactosidase activities such as *Lipomyces*, *Rhodotrula*, *Sirobasidium*, *Sporoboromyces*, *Cryptococcus* and *Kluyveromyces* are not sufficiently high in heat stability. Their repeated use at high temperatures is therefore not suitable.

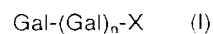
On the other hand, as a β -galactosidase having high heat stability and capable of withstanding repeated use at high temperatures, the enzyme of *Paecilomyces varioti* [Appl. Microbiol. Biotechnol., 27, 383-388 (1988)] is known. The optimal reaction pH of this enzyme is however 3.5, so that it is unsuitable for production steps in which lactose contained in cow milk (pH: approx. 7) is utilized.

SUMMARY OF THE INVENTION

There has hence been a demand for the provision of an enzyme suitable for an actual high-temperature enzyme reaction.

The present inventors have searched for enzymes in the nature, which have high β -D-galactosyl group transferring ability and high heat stability and can act in a neutral range. As a result, it has been found that cell strains belonging to the family of *Actinomycetaceae*, especially, those belonging to the genus *Saccharopolyspora*, the genus *Thermomonospora* or the genus *Thermoactinomyces* include those producing a β -galactosyltransferase which conforms with the above objects.

It has also been found that a heat-resistant β -galactosyltransferase can be used for the production of an oligosaccharide or saccharide-modified glycoside, which is represented by the following formula (I):



wherein Gal means a galactosyl group, X denotes a saccharide or glycoside and n stands for an integer of 0-4, by subjecting one of these cell strains to liquid culture or solid culture to have the strain produce the heat-resistant β -galactosyltransferase and, if necessary, refining or purifying or immobilizing the same.

The present invention therefore provides a novel heat-resistant β -galactosyltransferase, a production



process of the enzyme and a utilization method of the enzyme.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING

5 FIG. 1 is a diagram showing effects of manganese and zinc ions to heat stability.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION AND PREFERRED EMBODIMENTS

10 The heat-resistant β -galactosyltransferase according to the present invention can be obtained from a culture of a microorganism belonging to the family of *Actinomycetaceae*, especially, a cell strain belonging to the genus *Saccharopolyspora*, the genus *Thermomonospora*, the genus *Thermoactinomyces* or the like.

15 The present inventors, as described above, searched for β -galactosyltransferase-producing microorganisms in nature, which have high heat stability and can act in the neutral pH range. As a result, it was found that the strains belonging to the above family include those producing a heat-resistant β -galactosyltransferase. Of these, an actinomycete strain, SAM 1400, isolated from pastureland soil in Ishikawa-ken, Japan and belonging to the genus *Saccharopolyspora* produces the intended heat-resistant β -galactosyltransferase in a particularly large amount.

20 Taking the actinomycete strain, SAM 1400 as a typical example of β -galactosyltransferase-producing fungi useful in the practice of the present invention, its taxonomical characteristics will hereinafter be described.

(1) Morphological appearance:

25 SAM 1400 strain forms substrate mycelia and aerial mycelia, whose diameters range from 0.4 μ m to 0.8 μ m. Substrate mycelia are branched, and rarely separate. Aerial mycelia are branched and form 3-7 and, in some rare occasions, 10 or more long linear spore chains at tips thereof. Even when no aerial mycelia are formed, 2-6 spore chains are formed at substrate mycelia, inside an agar medium, on a surface of the agar medium, and from the surface of the agar medium into the air. Their sizes are 0.8-1.0 μ m in diameter, and 30 their surfaces are smooth. Structural elements such as sporangia, mycelial cord or sclerotia were not observed even after cultured for 14 days.

(2) Cultural characterization (cultured at 55° C for 14 days):

35 Sucrose-nitrate agar medium:

Growth:	Poor.
Aerial mycelia:	Not formed.
Reverse color:	Grayish yellow.
Soluble pigment:	None.

40 Glucose-asparagine agar medium:

Growth:	Poor.
Aerial mycelia:	Not formed.
Reverse color:	Grayish yellow.
Soluble pigment:	None.

45 Glycerin-asparagine agar medium:

Growth:	Abundant.
Aerial mycelia:	Not formed.
Reverse color:	Pale yellow.
Soluble pigment:	None.

50 Starch-inorganic salts medium:

Growth:	Poor.
Aerial mycelia:	Not formed.
Reverse color:	Yellow.
Soluble pigment:	None.

55 Tyrosine-agar medium:

Growth:	Abundant.
Aerial mycelia:	Not formed.
Reverse color:	Grayish yellow.



- Soluble pigment: None.
- Nutrient agar medium:
- Growth: Abundant.
- Aerial mycelia: Slightly formed.
- 5 Reverse color: Yellow.
- Soluble pigment: None.
- Yeast extract-malt extract agar medium:
- Growth: Abundant.
- Aerial mycelia: Poor, white.
- 10 Reverse color: Yellowish brown.
- Soluble pigment: None.
- Oat meal agar medium:
- Growth: Abundant.
- Aerial mycelia: Not formed.
- 15 Reverse color: Yellow.
- Soluble pigment: None.
- NaCl-agar medium *
- Growth: Abundant.
- Aerial mycelia: Abundant, white
- 20 Reverse color: Yellow.
- Soluble pigment: None.

(3) Physiological characterization:

- 25 i) Growth temperature range:
Growth was observed at 50 °C, 55 °C and 65 °C on nutrient agar medium containing 1% of glucose and also at 30 °C and 37 °C on tripticase soy broth (BBL) + 2% agar medium. The optimal growth temperature therefore appeared to be 50-55 °C.
- ii) Liquefaction of gelatin (55 °C):
- 30 Growth was not observed on any one of the media used for the gelatin liquefaction test.
- iii)
- Hydrolysis of starch: Negative.
- iv)
- Coagulation of skim milk: Negative.
- 35 v)
- Peptonization of skim milk: Negative.
- vi)
- Formation of melanin-like pigment:
- Peptone-yeast extract-iron agar medium: Negative *
- 40 vii)
- Tyrosine agar medium: Negative.
- Tripton-yeast extract agar medium: Negative.
- Reduction of nitrates: Positive.
- viii)
- 45 10% NaCl resistance: Positive.
- ix)
- Decomposition of guanine: Positive.
- x)
- Decomposition of elastin: Negative.
- 50 xi)
- Decomposition of xanthine: Positive.
- xii)
- Decomposition of hypoxanthine: Positive.

55 * Tripticase soy broth (BBL) containing 10% NaCl + 2% agar medium.

* Settling of a pale brown pigment was observed in the bottom of the medium.



xiii) Assimilation of carbon sources (cultured at 55 °C for 17 days on Pridham-Gottlieb agar medium):

	D-Glucose	+
	D-Xylose	+
	Lactose	+
5	L-Rhamnose	±
	L-Arabinose	±
	D-Fructose	+
	Raffinose	-
	D-Mannitol	+
10	Inositol	+
	Sucrose	-

wherein + : assimilable, ±: assimilation is doubtful, -: not assimilable.

(4) Chemotaxonomic properties:

15

a) 2,6-Diaminopimelic acid:

Whole cells were investigated in accordance with the method proposed by Stanek, J.L. and Roberts, G.D. in Applied Microbiology, **28**, 226 (1974). As a result, the existence of meso-2,6-diaminopimelic acid was confirmed.

20

b) Sugars:

The existence of arabinose and galactose was observed in a hydrolysate of whole cells.

c) Quinones:

Contained MK-9(H4) as a principal component. Also contained were MK-9(H6), MK-9(H8), MK-10(H4), MK-10(H6), MK-10(H8) and MK-10(H10).

25

d) Phospholipid type:

Phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol are present. This means that the phospholipid type is P-III type as proposed by Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A. (compiled Dietz, A. and Thayer, D.W.) in Actinomycete Taxonomy, 227-291 (1980).

e) Mycolic acid:

30

No mycolic acid is contained within the cells.

From these results, cell walls of SAM 1400 strain is found to be of IV-A type which contains meso-2,6-diaminopimelic acid, galactose and arabinose.

35

As morphological characteristics, SAM 1400 strain forms aerial mycelia, and branched, smooth and spherical spores are adhered on chains. Spore chains are short. There are 3-7 spore chains usually, but 10 or more spore chains may be observed in rare occasions. When formation of aerial mycelia was not observed on the other hand, formation of spore chains was observed on substrate mycelia. Each spore chain consisted of 2-6 smooth spherical spores located from a substrate mycelium to a tip of a short sporophore (this may not be observed in some instances) and extends upwardly from the surface of the agar medium. Quinones include MK-9(H4) as a principal component, the phospholipid type is P-III, and no mycolic acid is contained. Decomposes guanine, hypoxanthine and xanthine but does not decompose elastin. Grows at 30-65 °C and shows resistance to 10% NaCl.

40

Based on the above mycological characteristics, the taxonomic position of the strain was determined in accordance with Williams, S.T. (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 4 (1989). SAM 1400 strain was found to be an actinomycete belonging to the genus *Faenia rectivirgula*.

45

The type strain of *F. rectivirgula* and two strains identified as *F. rectivirgula* were compared with SAM 1400 strain in cultural characteristics, physiological properties and quinones. The results are shown in Table 1.

50

55



Table 1

Strain	SAM 1400	<i>F. rectivirgula</i> JCM-3057	<i>F. rectivirgula</i> JCM-3099	<i>F. rectivirgula</i> JCM-3034
Characteristics	Poor, but promoted by 10% NaCl addition.	Poor, but promoted by 10% NaCl addition.	Poor, but promoted by 10% NaCl addition.	Poor, but promoted by 10% NaCl addition.
Aerial mycelium forming ability	White	White	White	White
Color tone of aerial mycelia	White	White	White	White
Production of soluble pigment	-	-	-	-
Growth in the presence of 10% NaCl	+	+	+	+
Growth at 30°C	+	+	-	+
Growth at 65°C	+	+	+	-
Decomposition of guanine	+	+	+	-
Decomposition of elastin	-	-	-	-
Decomposition of xanthine	+	+	+	-
Decomposition of hypoxanthine	+	+	+	-
Reduction of nitrate salt	+	+	+	+



Table 1 (Cont'd)

Characteristics	Strain	SAM 1400	<i>F. rectivirgula</i> JCM-3057	<i>F. rectivirgula</i> JCM-3099	<i>F. rectivirgula</i> JCM-3034
Coagulation and peptonization of milk		-	-	-	-
Decomposition of starch		-	-	-	-
Liquefaction of gelatin		No growth	No growth	No growth	-
(Assimilation of carbon sources)					
D-Glucose		+	+	+	+
D-Xylose		+	+	+	+
Lactose		+	+	+	-
L-Rhamnose		+	-	+	-
L-Arabinose		+	-	+	-
D-Fructose		+	+	+	+
Raffinose		-	-	-	-
D-Mannitol		+	+	+	+



Table 1 (Cont'd)

Strain Characteristics	SAM 1400	<i>F. rectivirgula</i> JCM-3057	<i>F. rectivirgula</i> JCM-3099	<i>F. rectivirgula</i> JCM-3034
Inositol	+	+	+	+
Sucrose	-	-	-	-
(Composition of menaquinone *)				
MK- 9 (H 4)	++	+++	++	+++
MK- 9 (H 6)	+	+	+	+
MK- 9 (H 8)	+	-	+	Trace
MK-10 (H 4)	+	+	+	-
MK-10 (H 6)	+	+	+	-
MK-10 (H 8)	+	-	+	-
MK-10 (H10)	Trace	-	+	-

* The proportions (%) of the menaquinones contained are shown in accordance with the following four-stage system:

Trace: <3%, +: 3-14%, ++: 15-49%, +++: >50%.

As is shown in Table 1, SAM 1400 strain and the three strains of *F. rectivirgula*, including the type strain thereof, showed toxomical properties which conformed very well.

From the foregoing, the present inventors identified SAM 1400 strain as *F. rectivirgula*. However, Korn-Wendisch et al. identified the genus *Faenia* as identical to the genus *Saccharopolyspora* by their chemical taxonomic properties such as the compositions of cellular fatty acids, their quinones and their phospholipid



types, moved *F. rectivirgula* to the genus *Saccharopolyspora* and proposed the new combination, *Saccharopolyspora rectivirgula* [International Journal of Systematic Bacteriology, **39**, 430-441 (1989)].

Accordingly, the present inventors identified the present cell strain as *Saccharopolyspora rectivirgula* in accordance with the proposal by Korn-Wendisch et al. [International Journal of Systematic Bacteriology, **39**, 430-441 (1989)].

Incidentally, SAM 1400 strain has been named *Saccharopolyspora rectivirgula* SAM 1400 and deposited under FERM BP-2768 with Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of Industrial Trade and Industry, Government of Japan.

Examples of novel β -galactosyltransferase-producing actinomycetes, which belong to other genera respectively, include *Thermoactinomyces* sp. SAM 1544, *Thermoactinomyces* sp. SAM 1545, *Thermomonospora* sp. SAM 1546 and *Thermomonospora* sp. SAM 1547.

These actinomycetes have also been deposited under FERM BP-2769, FERM BP-2770, FERM BP-2771 and FERM BP-2772, respectively, with Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of Industrial Trade and Industry, Government of Japan.

Production of the novel β -galactosyltransferase making use of one of the above actinomycetes is conducted by inoculating the actinomycete to a culture medium and then culturing the actinomycete in a manner known *per se* in the art.

Culture of each cell strain can be effected by conventional liquid culture or solid culture such as aerated-stirring culture, shake culture or standing culture.

The culture medium contains lactose, glucose, sucrose and/or starch as carbon sources, peptone, yeast extract, urea, ammonium sulfate and/or amino acids as nitrogen sources, and potassium phosphate, magnesium sulfate, calcium chloride and/or the like as inorganic salts. The culture medium may also be added suitably with trace metals such as Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} and/or the like, vitamins such as biotin and/or thiamine, as needed.

No particular limitation is imposed on the culture temperature as long as it is within a temperature range that permits growth, but 50°C or so is desirable. The culture is carried out for 24-192 hours or so.

To collect the β -galactosyltransferase of the present invention from the culture thus obtained, the culture is separated into a broth fraction and a cell fraction by centrifugal separation, filtration or the like. Known methods such as ultrafiltration, dialysis, salting-out, solvent precipitation, ion-exchange chromatography, gel chromatography, adsorption chromatography, hydrophobic chromatography and isoelectric precipitation are applied either singly or in combination to the active fraction of the β -galactosyltransferase, whereby a concentrated or purified sample of the β -galactosyltransferase can be obtained.

Of the heat-resistant β -galactosyltransferases of the present invention isolated and purified as described above, the followings are enzymochemical properties of the enzyme produced by *Saccharopolyspora rectivirgula* SAM 1400:

Enzymochemical properties:

(1) Action

Transfer reaction.

Forms 1 mole of a β -D-galactopyranoside Gal-Y and 1 mole of X from 1 mole of another β -D-galactopyranoside Gal-X and 1 mole of a galactosyl group receptor, Y wherein X and Y are both compounds other than water and are each a saccharide or aglycon.

Hydrolysis:

Forms 1 mole of X and 1 mole of galactose by hydrolyzing 1 mole of the β -D-galactopyranoside Gal-X.

(2) pH Stability

After incubated at 55°C for 15 minutes in 0.01 M acetate buffer (pH 3.5-6.5), 0.01 M phosphate buffer (pH 6.0-8.0) and 0.01 M pyrophosphate buffer (pH 8.0-9.5), the residual activities at the respective pH were measured. As a result, the enzyme was found stable at pH 5.0 and higher.

(3) Heat stability:

After incubated at 30-80°C for 1 hour in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.2), the residual activities at the respective temperatures were measured. As a result, the enzyme was found substantially stable up to



60 °C. In addition, the enzyme was also treated at 65 °C for 24 hours in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.2) which contained 1 M of lactose. The residual activity was then measured. As a result, no inactivation was observed.

5 (4) Optimal pH:

The optimal pH in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0-8.0) was 7.2.

(5) Substrate specificity:

10

Various β -galactopyranosides and their analogous compounds were hydrolyzed at the substrate concentration of 10 mM. The results are summarized in Table 2.

Table 2

15

Substrate (10 mM)	Relative activity
p-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	100%
p-Nitrophenyl- α -D-galactopyranoside	0%
p-Nitrophenyl- β -D-xylopyranoside	<1%
p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside	<1%
p-Nitrophenyl- β -D-fructoside	0%
p-Nitrophenyl- β -D-mannoside	0%
Lactose	161%

35

(6) Molecular weight:

40 By high performance liquid gel chromatography making use of "TSK-G3000 SW-XL Column" (mobile phase: 0.01 M phosphate buffer containing 0.15 M KCl, pH 7.2; flow rate: 1.0 ml/min), the molecular weight of the enzyme was determined from its relative elution retention times to those of various standard proteins produced by Oriental Yeast Co., Ltd. The molecular weight of the enzyme was 140,000 \pm 20,000.

(7) Molecular weight and structure of subunit:

45

The molecular weight of the subunit of the present enzyme was determined as 140,000 \pm 20,000 by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Using a Phast-Gel electrophoresis apparatus, the molecular weight of the subunit was determined from its relative migration distances to the various standard proteins. The present enzyme appears to be a monomer.

50

(8) Inhibitors:

The present enzyme was inhibited by metal ions, such as Hg^{2+} and Cu^{2+} , and ethylenediamine tetraacetate (see Table 3).

55



Table 3

Compound	Residual activity
CdCl ₂	96%
ZnCl ₂	122%
CaCl ₂	87%
BaCl ₂	96%
NiCl ₂	59%
MnCl ₂	103%
CoCl ₂	97%
FeCl ₂	87%
CuCl ₂	28%
EDTA	5%
2-Mercaptoethanol	96%
DTNB	107%
Monoiodoacetic acid	69%

(9) Activity measurement:

Measurement of the hydrolytic activity of p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside was conducted by spectroscopically determining p-nitrophenol formed by the hydrolysis of the substrate.

Namely, 0.10 ml of an enzyme solution was added to 0.60 ml of 0.01 M phosphate buffer (pH 7.2) which contained 0.01 M of p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside. Increase in absorbance at 405 nm was followed at 55°C. Using the molecular extinction coefficient ($\epsilon_{405} = 1.34 \times 10^4$) of p-nitrophenol at pH 7.2, the amount (μ mol) of p-nitrophenol so formed was determined by calculation. One enzyme unit (pNPGU) defined by hydrolysis of p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside is the amount of the enzyme capable of hydrolyzing 1 μ mol of p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside within 1 minute. Measurement of the hydrolytic activity of lactose was conducted by spectrophotometrically and quantitatively analyzing glucose formed by the decomposition of the substrate. Namely, 0.10 ml of an enzyme solution was added to 0.90 ml of 0.01 M phosphate buffer (pH 7.2) which contained 0.1 M of lactose. They were reacted at 55°C for 10 minutes, followed by the addition of 0.05 ml of 33% trichloroacetic acid to terminate the reaction. To 0.1 ml of the resulting reaction mixture, 1.0 ml of a glucose determination kit (product of Boehringer Mannheim GmbH) was added. After the mixture thus prepared was left over at room temperature for 45 minutes, the absorbance was measured at 660 nm. One enzyme unit (LU) defined by the hydrolysis of lactose is the amount of the enzyme capable of hydrolyzing 1 μ mol of lactose within 1 minute.

The β -galactosyltransferase of the present invention has been found novel from the various enzymological properties described above.

The present invention will next be described in further detail by the following examples.

Example 1



A culture medium (pH 7.2) containing 3.0 % of lactose, 1.4% of "AMINOSAN V3" (beet extract), 0.2 % of monosodium glutamate, 0.1% of yeast extract, 0.1% of monopotassium phosphate and 0.05% of magnesium sulfate was placed 100 ml by 100 ml in 500-ml Meyer flasks, followed by sterilization at 120 °C and 1 atm for 15 minutes in an autoclave. SAM 1400 strain was then inoculated to the culture medium at the rate of one inoculating loopful per flask and was subjected to aerated-stirring culture at 55 °C for 120 hours. A supernatant (2.2 l) which had been obtained by subjecting the cultured broth to centrifugation after completion of the culture applied to a column of SEPABEADS FP-DA13 (Mitsubishi Kasei Corp., 5 cm x 20 cm) equilibrated with 10 mM phosphate buffer (pH 7.2). After the column was washed first with the above buffer and then with the above buffer containing 0.3 M of potassium chloride, the β -galactosyltransferase was eluted with the above buffer which contained 0.5 M of potassium chloride. Active fractions were concentrated by ultrafiltration and then dialyzed against 10 mM phosphate buffer (pH 7.2).

Example 2

The inner dialyzate was applied to a column of DEAE-Sepharose CL-6B (product of Pharmacia AB, 2.8 cm x 20 cm) which had been equilibrated with 10 mM phosphate buffer (pH 7.2). After the column was washed first with the above buffer and then with the above buffer containing 0.2 M of potassium chloride, the column was subjected eluted by linear concentration gradient of from 0.2 M potassium chloride to 0.6 M potassium chloride (total volume: 400 ml) so that β -galactosyltransferase was eluted. After active fractions were concentrated by ultrafiltration, the concentrate was loaded in several portions in a "TSK Gel G3000SW-XL" (TOSOH CORP.) which had been equilibrated with 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.15 M of potassium chloride (flow rate: 1.0 ml/min; detection: absorbance at 280 nm). Active fractions were concentrated by ultrafiltration and then dialyzed against 10 mM phosphate buffer (pH 7.2). Purified β -galactosyltransferase obtained from the above had 240 pNPGU of an amount activity and 10 pNPGU/mg of comparative activity.

Example 3

Lactose (5 g) was dissolved in 0.05 M acetate buffer (pH 6.0) to give the volume of 10 ml, to which the β -galactosyltransferase 10 pNPGU obtained in Example 1 was added. They were then reacted at 65 °C for 4 hours. The reaction mixture was treated at 95 °C for 5 minutes to terminate the reaction. A portion of the reaction mixture was diluted tenfold. By analyzing it by high-performance chromatography with a column of Shodex Ionpack KS801 (mobile phase: water; column temperature: 70 °C; flow rate: 1 ml/min; detector: differential refractometer), the saccharide composition of the reaction mixture was determined. The reaction mixture contained 7% of tetra- or higher saccharides, 21% of trisaccharides, 48% of disaccharides and 24% of monosaccharides, all by wt.% based on the whole saccharides.

Example 4

Five grams of the enzyme immobilizing matrices "FE4612" (product of Japan Organo Co., Ltd.) were stirred at 50 °C for 2 hours in 4% NaOH and then washed with deionized water. The carrier was suspended in 15 ml of 5% glutaraldehyde, followed by stirring for 1 hour. The carrier was then washed with 10 mM phosphate buffer, suspended in 10 mM phosphate buffer containing 1,000 U of the enzyme, and then stirred for 2 hours to immobilize the same. The matrices were washed with 10 mM of phosphate buffer. It was used to provide an immobilized β -galactosyltransferase. The activity yield at the immobilization was 87%. One gram of the immobilized β -galactosyltransferase was suspended in 100 ml of 0.05 M acetate buffer (pH 6.0) which contained 60% (w/v) of lactose. The suspension was stirred at 65 °C for 24 hours, whereby a reaction was performed. A portion of the reaction mixture was diluted tenfold. By analyzing it by high-performance chromatography with a column of Shodex Ionpack KS801 (mobile phase: water; column temperature: 70 °C; flow rate: 1 ml/min; detector: differential refractometer), the saccharide composition of the reaction mixture was determined. The reaction mixture contained 3% of tetra- or higher saccharides, 25% of trisaccharides, 58% of disaccharides and 14% of monosaccharides, all by wt.% based on the whole saccharides. Taking the above reaction as 1 cycle, it was repeated. Assuming that the half-life of the activity of the immobilized β -galactosyltransferase is governed by a first-order reaction, the half-life was determined by calculation. The half-life of the activity of the immobilized β -galactosyltransferase was determined to be at least 300 cycles.



Example 5

Four cell strains, i.e., *Thermomonospora* sp. SAM 1546, *Thermomonospora* sp. SAM 1547, *Thermoactinomyces* sp. SAM 1544 and *Thermoactinomyces* sp. SAM 1545 were separately subjected to shaking culture at 55 °C for 4 days in 500-ml flasks each of which contained 100 ml of a culture medium (pH 7.2) containing 3% of lactose, 0.2% of peptone, 0.02% of yeast extract, 0.2% of KH_2PO_4 , 0.3% of NaCl and 0.01% of $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, whereby β -galactosyltransferase samples were obtained, respectively.

The thus-obtained β -galactosyltransferase samples had the properties shown in Table 4.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55



Table 4

Characteristics	Strain	Thermomonospora s.p. SAM1546	Thermomonospora s.p. SAM1547	Thermoactinomyces s.p. SAM1544	Thermoactinomyces s.p. SAM1545
(Action)					
Transfer reaction ¹⁾		+	+	+	+
Hydrolysis		+	+	+	+
(Substrate specificity of hydrolysis)					
Lactose ²⁾		+	+	+	+
p-Nitrophenyl- β -galactoside ³⁾		+	+	+	+
p-Nitrophenyl- α -galactoside ⁴⁾		-	-	-	-
Optimal pH ⁵⁾		6.0-7.5	6.0-7.5	6.0-7.5	6.0-7.5
pH stability ⁶⁾		5-8	5-8	5-8	5-8
Heat stability ⁷⁾		About 82%	About 82%	About 88%	About 88%

Note: +: Catalyzes. -: Does not catalyze.

1) Reacted at 55°C for 240 minutes in 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 1 mM lactose.

2) Reacted at 55°C for 10 minutes in 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 10 mM lactose.

3) Reacted at 55°C for 5 minutes in 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 10 mM p-nitrophenyl- β -galactoside.

4) Reacted at 55°C for 5 minutes in 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 10 mM p-nitrophenyl- α -galactoside.

5) Reacted at 55°C for 5 minutes in 10 mM acetate buffer (pH 4.0-6.5) or phosphate buffer (pH 6.0-8.5) containing 10 mM p-nitrophenyl- β -galactoside.

6) Ice-cooled immediately after incubation at 55°C for 15 minutes in 10 mM acetate buffer (pH 4.0-6.5) or phosphate buffer (pH 6.0-8.5). Residual activity was determined by measurement under the above conditions 3).

7) Ice-cooled immediately after incubation at 60°C for 1 hour in 10 mM acetate buffer (pH 7.2). Residual activity was determined by measurement under the above conditions 3).

Example 6

The lactase ("Lactase Y-A0", trade name; product of YAKULT HONSHA CO., LTD.) derived from *Aspergillus oryzae*, the lactase ("Biolacta", trade mark; product of Daiwa Kasei K. K.) derived from *Bacillus*



circulans and the β -galactosyltransferase of the present invention were separately dissolved in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) to prepare 0.1 mg/ml enzyme solutions. After the respective enzyme solution were incubated at 60°C for 1 hour, they were immediately ice-cooled. The residual activities of the respective enzymes were then measured in accordance with the optimal conditions described on their use instructions. As a result, the residual activities of the lactase derived from *Aspergillus oryzae*, the lactase derived from *Bacillus circulans* and the β -galactosyltransferase of the present invention were 1%, 1% and 96%, respectively.

Example 7

β -Galactosyltransferases which had been obtained from cultures of *Thermomonospora* sp. SAM 1546, *Thermomonospora* sp. SAM 1547, *Thermoactinomyces* sp. SAM 1544 and *Thermoactinomyces* sp. SAM 1545, respectively, were separately added in an amount of 1 pNPGU to portions of a solution of 0.5 g of lactose in 0.05 M acetate buffer (pH 6) to give final volumes of 1.0 ml. They were separately reacted at 65°C for 8 hours.

The reaction mixtures were treated at 95°C for 5 minutes to terminate the reactions. Portions of the reaction mixtures were diluted tenfold and were then analyzed by high-performance chromatography with a column of Shodex Ionpack KS-801 (mobile phase: water; column temperature: 70°C; flow rate: 1 ml/min; detector: differential refractometer), so that the saccharide compositions of the reaction mixtures were determined.

As a result, irrespective of the source for the β -galactosyltransferase used, the resultant reaction mixture contained 3-7% of tetra- or higher saccharides, 18-21% of trisaccharides, 48-52% of disaccharides and 21-26% of disaccharides, all wt.% based on the whole saccharides.

Example 8

Production of lactose-decomposed milk containing galactooligosaccharide by the use of β -galactosyltransferase of *Saccharopolyspora rectivirgula*:

Cow milk (lactose content: 4.8%, nonfat milk solids content: 8.3%) was heated to 60°C, to which β -galactosyltransferase obtained from *Saccharopolyspora rectivirgula* was added in an amount of 16-24 LU per gram of lactose. They were reacted for 4-7 hours. Then, by high-performance liquid chromatography with a column of Shodex Ionpack KS801 (mobile phase: water; column temperature: 70°C; flow rate: 1.0 ml/min; detector: differential refractometer), the saccharide composition of the cow milk after the above treatment was analyzed. The results are shown in Table 5. Incidentally, the lactose hydrolyzing activity of the galactosyltransferase remained substantially 100% even after the above reaction.



Table 5

	Treatment conditions (Amount of enzyme added, reaction time)		
	Untreated	16LU/g-lactose 7 hr	24LU/g-lactose 4 hr
Saccharide composition (% based on whole saccharides)		10.7%	11.4%
	Oligosaccharides of trisaccharides and higher		
	Disaccharides	23.3	24.8
	Monosaccharides	66.0	63.9

Example 9

The stability of the β -galactosyltransferase obtained from *Saccharopolyspora rectivirgula* in cow milk in the production of lactose-decomposed milk containing galactooligosaccharide was investigated in further detail.



Portions of cow milk (lactose content: 4.8%, non-fat milk solids content: 8.3%) were heated to 60°C, 65°C and 70°C, respectively, to which the β -galactosyltransferase of *Saccharopolyspora rectivirgula* was added in an amount of 24 pNPGU per ml of the cow milk to initiate a reaction. To determine the residual activity of the enzyme in the reaction, portions (0.02 ml) of the reaction mixtures were sampled 1, 2, 4 and 8 hours after the initiation of the reaction and were added to 1.0 ml-portions of cow milk. They were reacted at 60°C for 1 hour, during which the rates of decrement of lactose in the portions of cow milk were measured, respectively. For the same of comparison, a similar experiment was also conducted with respect to the β -galactosidase ("Biolacta", trade mark; product of Daiwa Kasei K.K.) of *Bacillus circulans*. The results are summarized in Table 6.

Table 6

Treatment temp. (°C)	Treatment time (hr)	Residual activity of enzyme	
		<i>S. rectivirgula</i>	<i>B. circulans</i>
60	0	100	100
	1	100	77
	2	100	79
	4	100	76
	8	100	71
65	0	100	100
	1	100	39
	2	100	15
	4	100	0
	8	100	0
70	0	100	100
	1	90	3
	2	80	0
	4	60	0
	8	11	0

Example 10

Portions of the heat-resistant β -galactosyltransferase were dialyzed overnight at 4°C against buffers A and B, respectively. After a further portion of the heat-resistant β -galactosyltransferase was incubated at 4°C for 1 hour in the presence of ethylenediamine tetraacetate (EDTA; final concentration: 1 mM), the resultant mixture was dialyzed overnight at 4°C against buffer C.

The respective inner dialyzates were separately heated at 60°C for 5, 10, 30, 60, 120 and 240 minutes. At the end of each heat treatment time, the thus-treated inner dialyzates were sampled in a predetermined amount and immediately ice-cooled. Using p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside as a substrate, the residual activities of the enzyme were measured by the method described above under "Enzymochemical properties (9)".

Incidentally, buffer C is 0.01 M phosphate buffer (pH 7.2), while buffers A and B are the same as buffer C except for the inclusion of 20 μ M of $MnCl_2$ and 20 μ M of $ZnCl_2$, respectively.

The results so obtained are diagrammatically shown in FIG. 1.



Claims

1. A novel β -galactosyltransferase having the following physicochemical properties:

(1) Action

Transfer reaction:

Forms 1 mole of a β -D-galactopyranoside Gal-Y and 1 mole of X from 1 mole of another β -D-galactopyranoside Gal-X and 1 mole of a galactosyl group receptor, Y wherein X and Y are both compounds other than water and are each a saccharide or aglycon.

Hydrolysis:

Forms 1 mole of X and 1 mole of galactose by hydrolyzing 1 mole of the β -D-galactopyranoside Gal-X.

(2) Substrate specificity

Hydrolyzes lactose and p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside but does not hydrolyze p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside.

(3) Optimal pH

5.0-8.0

(4) pH Stability

Stable at pH 5-8 (both inclusive) when treated at 55° C for 15 minutes.

(5) Heat stability

Retains at least 80% of its initial activity even after incubated at 60° C for 1 hour in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.2) or at least 80% of its initial activity even after incubated at 65° C for 24 hours in the same buffer containing at least 1 M of lactose.

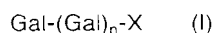
2. The novel β -galactosyltransferase of claim 1, produced by a microorganism belonging to the family of *Actinomycetaceae*.

3. The novel β -galactosyltransferase of claim 2, wherein the microorganism belonging to the family of *Actinomycetaceae* is selected from fungi belonging to the genus *Saccharopolyspora*, the genus *Thermomonospora* or the genus *Thermoactinomyces*.

4. A process for the production of a novel β -galactosyltransferase, which comprises culturing a microorganism belonging to the family of *Actinomycetaceae* and capable of producing the novel β -galactosyltransferase according to claim 1 and isolating and collecting the β -galactosyltransferase from the resultant culture.

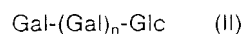
5. The process of claim 4, wherein the micro-organism belonging to the family of *Actinomycetaceae* and capable of producing the novel β -galactosyltransferase is a microorganism belonging to the genus *Saccharopolyspora*, the genus *Thermomonospora* or the genus *Thermoactinomyces*.

6. A process for the production of an oligosaccharide or a saccharide-modified glycoside represented by the following formula (I):



wherein Gal means a galactosyl group, X denotes a saccharide or glycoside and n stands for an integer of 0-4, which comprises using the novel β -galactosyltransferase according to claim 1.

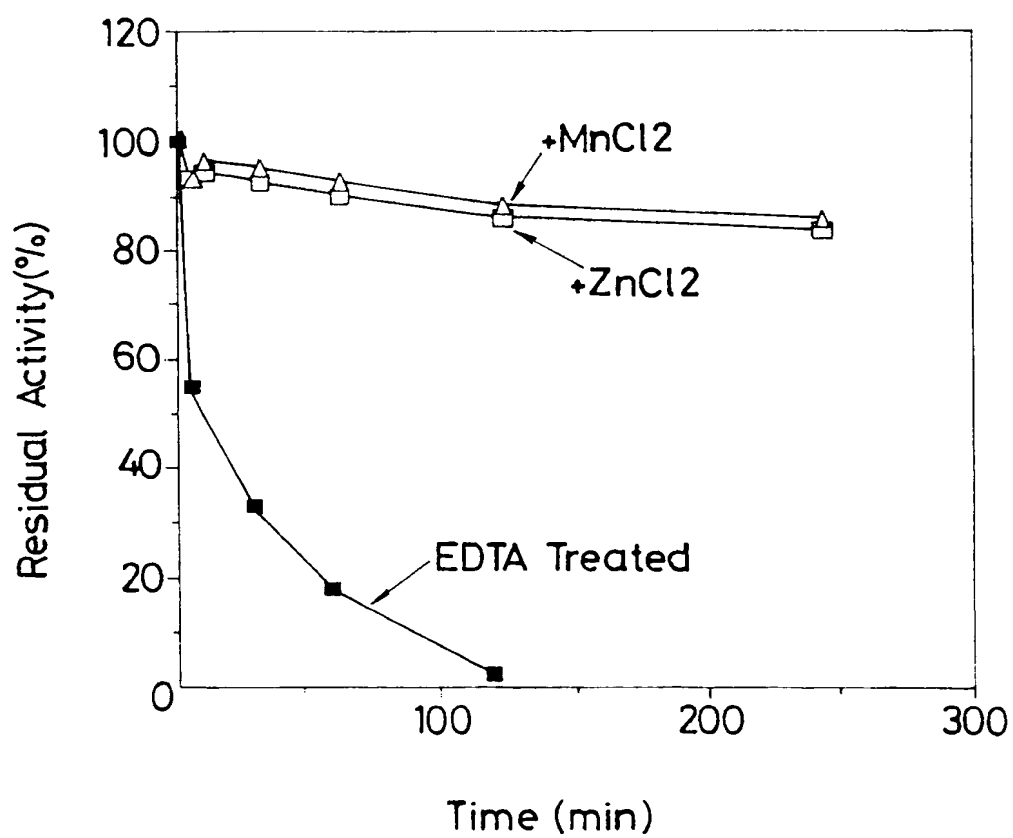
7. A process for the production of processed galactooligosaccharide-containing milk, which comprises causing the β -galactosyltransferase to act on mammal's milk, whereby lactose in the mammal's milk is at least partly converted to a galactooligosaccharide represented by the following formula:



wherein Gal means a galactosyl group, Glc denotes a glucosyl group and n stands for an integer of 1-4.



FIG. 1







European
Patent Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number

EP 91 10 3967

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl.5)
X	EP-A-0 323 201 (KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA) * whole document, in particular page 4, lines 17-21 *	1,6,7	C 12 N 9/10 A 23 C 9/12 C 12 P 19/04
Y	---	2-5	
X	WORLD PATENT INDEX LATEST Derwent Abstract no. 83-708567 [28], Derwent Publications Ltd., London, GB; & JP - A - 58094367 (DAINIPPON INK CHEM KK et al.) 04.06.1983 * abstract *	1	
A	idem ---	6,7	
D,A	WORLD PATENT INDEX LATEST Derwent Abstract no. 87-012547 [02], Derwent Publications Ltd., London, GB; & JP - A - 61271999 (NISSHIN SEITO KK) 02.12.1986 * abstract *	6,7	
D,A	WORLD PATENT INDEX LATEST Derwent Abstract no. 86-321500 [49], Derwent Publications Ltd., London, GB; & JP - A - 61236790 (NISSHIN SEITO KK) 22.10.1986 * abstract *	6,7	
A	EP-A-0 279 778 (RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION OF JAPAN) * whole document *	1	
A	WORLD PATENT INDEX LATEST Derwent Abstract no. 86-014446 [03], Derwent Publications Ltd., London, GB; & DD - A - 227449 (AKAD WISSENSCHAFT DDR) 18.05.1985 * abstract *	2,3	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl.5)
			C 12 N 9/10 C 12 P 19/04 A 23 C 9/12 C 12 N 9/00 C 12 N 9/38
The present search report has been drawn up for all claims			
Place of search Berlin		Date of completion of search 03 June 91	Examiner JULIA P.
<p>CATEGORY OF CITED DOCUMENTS</p> <p>X: particularly relevant if taken alone Y: particularly relevant if combined with another document of the same category A: technological background O: non-written disclosure P: intermediate document T: theory or principle underlying the invention</p> <p>E: earlier patent document, but published on, or after the filing date D: document cited in the application L: document cited for other reasons &: member of the same patent family, corresponding document</p>			





European
Patent Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number

EP 91 10 3967

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl.5)
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 13, no. 11 (558), 11 January 1989; & JP - A - 63219399 (UNITIKA LTD) 13.09.1988 * abstract * - - - - -	2-5	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl.5)
The present search report has been drawn up for all claims			
Place of search		Date of completion of search	Examiner
Berlin		03 June 91	JULIA P.
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			



(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
à utiliser que pour les
commandes de reproduction

2 640 997

(21) N° d'enregistrement national :

89 17127

(51) Int Cl⁵ : C 12 P 19/02.



(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 22 décembre 1989.

(30) Priorité : JP. 22 décembre 1988, n° 324855/1988 et 29 juin 1989, n° 168103/1989.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 26 du 29 juin 1990.

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : Société dite : AJINOMOTO CO., INC. — JP.

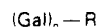
(72) Inventeur(s) : Norimasa Oonishi et Kenzo Yokozeki, Central Research Laboratories of Ajinomoto Co., Inc.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Beau de Loménie.

(54) Procédé pour la fabrication d'un produit de transfert de galactose.

(57) Selon l'invention on fait réagir sur le lactose ou un donneur de galactose tel que o-nitrophényl-β-D-galactopyranoside, etc. et un récepteur de galactose tel qu'un sucre, un alcool des sucres, un nucléoside, un alcool et leurs dérivés etc. un micro-organisme capable de produire à partir du lactose ou d'un donneur de galactose tel que o-nitrophényl-β-D-galactopyranoside etc. et d'un récepteur de galactose tel qu'un sucre, un alcool des sucres, un nucléoside, un alcool et leurs dérivés etc., un produit de transfert de galactose représenté par la formule générale :



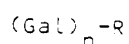
dans laquelle Gal représente un reste de galactose, n représente un entier de 1 à 4 et R représente un reste de sucre, d'alcool des sucres, de nucléoside, d'alcool et leurs dérivés, et on recueille le produit de transfert de galactose produit.

FR 2 640 997 - A1

D



La présente invention concerne un procédé pour la fabrication d'un produit de transfert de galactose qui consiste à faire agir sur le lactose ou un donneur de galactose tel que o-nitrophényl- β -D-galactopyrannoside, etc. et un récepteur de galactose tel qu'un sucre, un alcool des sucres, un nucléoside, un alcool et leurs dérivés etc. un micro-organisme capable de produire à partir du lactose ou d'un donneur de galactose tel que o-nitrophényl- β -D-galactopyrannoside etc. et d'un récepteur de galactose tel qu'un sucre, un alcool des sucres, un nucléoside, un alcool et leurs dérivés etc., un produit de transfert de galactose représenté par la formule générale :



dans laquelle Gal représente un reste de galactose, n représente un entier de 1 à 4 et R représente un reste de sucre, d'alcool des sucres, de nucléoside, d'alcool et leurs dérivés, et à recueillir le produit de transfert de galactose produit.

Ces dernières années, on s'est intéressé à des composés contenant un reste de galactose, spécialement des produits de transfert sur des sucres (spécialement le lactose), comme facteurs pour la prolifération des bifidobactéries (BIFIDUS, vol 2, n° 2, 1989). En outre, on observe une modification des propriétés physiques telles qu'une solubilité accrue etc., dans les produits de transfert sur les alcools des sucres, les nucléosides, les alcools etc. Ces produits de transfert sont d'un grand intérêt pour l'utilisation dans l'application aux médicaments etc.

Pour la production de produits de transfert de galactose, on connaît un procédé utilisant la β -galactosidase de E. coli qui consiste à transférer le reste de galactose sur le fructose ou la N-acétylglucosamine (Biotechnology Letters, 9, 243 (1987)) et un procédé qui consiste à transférer le reste de galactose sur des nucléosides tels que l'adénosine, etc. (Journal of Agricultural Association, Japan, 48, 605 (1979)). Cependant, ces procédés sont désavantageux car le rendement de production des produits de transfert est mauvais. En outre, pour la production d'un produit de



transfert de galactose dans lequel le donneur de galactose est le lactose et le récepteur de galactose est le lactose (galactose-oligosaccharide), on connaît un procédé utilisant la β -galactosidase de Aspergillus oryzae (demande de brevet japonais examinée, publiée n° 58-20266). Cependant, le procédé est d'une mauvaise praticabilité car le rendement de production du galacto-oligosaccharide est mauvais.

Dans les circonstances qui précèdent, la demanderesse a effectué des recherches sur les micro-organismes capables de produire et d'accumuler un produit de transfert de galactose à partir de galactose ou de donneur de galactose tel que o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside, etc. et d'un récepteur de galactose tel qu'un sucre, un alcool des sucres, un nucléoside, un alcool et leurs dérivés, etc. avec un rendement élevé et une vitesse d'accumulation élevée. En conséquence, on a trouvé qu'un micro-organisme appartenant au genre Rhodotorula, Sterigmatomyces, Cryptococcus, Geotrichum, Apiotrichum, Corynebacterium, Bacillus, Flavobacterium, Rhizobium ou Sirobasidium pouvait produire des produits de transfert de galactose à partir du lactose ou d'un donneur de galactose tel que o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside, etc. et d'un récepteur de galactose tel qu'un sucre, un alcool des sucres, un nucléoside, un alcool et leurs dérivés etc. avec une vitesse d'accumulation et un rendement extrêmement élevés. La présente invention repose donc sur cette découverte.

Des exemples spécifiques des micro-organismes qui peuvent être utilisés dans la présente invention comprennent Rhodotorula minuta IFO 879, Sterigmatomyces elviae AJ 14199 (FERM BP-2586, FERM P-10001), Cryptococcus laurentii IFO 609, Geotrichum amycelicum AJ 14196 (FERM P-10071), Apiotrichum humicola ATCC 14438, Corynebacterium michiganense ATCC 492, Bacillus megaterium AJ 1272 (FERM P-3747), Flavobacterium aurantianum AJ 2462 (FERM P-10069), Rhizobium meliloti AJ 2823 (FERM P-8197) et Sirobasidium magnum CBS 6803.

Pour cultiver ces micro-organismes, on peut utiliser n'importe quelle source de substances nutritives, pour autant que ces micro-organismes puissent ordinairement les assimiler. On peut



utiliser un milieu ordinaire formulé convenablement avec, par exemple, des hydrates de carbone tels que glucose, saccharose etc. ; des alcools tels qu'éthanol, glycérol, etc. ; des acides organiques tels qu'acide acétique, acide propionique etc. ; des sources de carbone telles qu'huile de soja etc. ou leurs mélanges ; des sources de nutriments inorganiques ou organiques azotés telles qu'extrait de levure, peptone, extrait de viande, liqueur de trempage de maïs, sulfate d'ammonium, ammoniac etc. ; des sources de nutriments inorganiques telles que phosphates, magnésium, fer, manganèse, potassium etc. ; des vitamines telles que biotine, thiamine etc. Pour la culture, le pH est de 4,0 à 9,5 et on met en oeuvre la culture aérobie à une température de 20 à 40°C pendant 12 h à 5 jours.

La production du produit de transfert de galactose peut être mise en oeuvre en supplémentant le milieu au stade initial de culture ou pendant la culture avec du lactose ou des donneurs de lactose tels que le o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside, etc. et des récepteurs de galactose tels que sucres, alcools des sucres, nucléosides, alcools et leurs dérivés etc., et en cultivant le micro-organisme. Ou bien encore, le produit de transfert de galactose peut aussi être produit en utilisant des micro-organismes au repos.

Comme procédés utilisant des micro-organismes au repos, on citera un procédé utilisant la solution de culture telle quelle, un procédé qui consiste à isoler les cellules par centrifugation etc., à remettre les cellules en suspension dans un tampon au phosphate etc., à ajouter à la suspension le lactose ou les donneurs de galactose tels que o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside etc., et les récepteurs de galactose tels que sucres, alcools des sucres, nucléosides, alcools et leurs dérivés etc. et en les faisant réagir, et ainsi de suite. Les micro-organismes peuvent être des cellules viables ou bien peuvent être soumis à des traitements tels que traitement par l'acétone, séchage par congélation etc. En outre, ces micro-organismes peuvent aussi être immobilisés sur un support ou bien peuvent être utilisés sous forme de bio-réacteurs en utilisant une membrane d'ultrafiltration.



Dans la réaction pour la formation du produit de transfert de galactose à partir de lactose ou des donneurs de galactose tels que o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside etc. et des récepteurs de galactose tels sucres, alcools des sucres, nucléosides, alcools et leurs dérivés etc., la quantité de lactose ou des donneurs de galactose tels que o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside etc. et des récepteurs de galactose tels que sucres, alcools des sucres, nucléosides, alcools et leurs dérivés, etc. n'est pas particulièrement limitée mais la quantité est dans la gamme de 0,5 à 70% en poids, de préférence de 1 à 30% en poids, lorsqu'elle est calculée en lactose ; lorsqu'elle est calculée en o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside, elle est dans la gamme de 0,2 à 10% en poids, de préférence de 0,5 à 2% en poids ; et lorsqu'elle est calculée en sucres, alcools des sucres, nucléosides, alcools et leurs dérivés, etc. elle est dans la gamme de 0,1 à 50% en poids, de préférence de 1,0 à 30% en poids. La réaction est mise en oeuvre en général à une température de 20 à 70°C, de préférence de 25 à 65°C dans une gamme de pH de 2 à 10, de préférence de 3 à 7, pendant 2 h à 10 jours.

Lorsque la réaction est terminée, si nécessaire, les cellules sont isolées de la solution de réaction. Le produit de transfert de galactose peut être purifié au moyen d'une résine échangeuse d'ions, par filtration sur gel, par adsorption par le charbon actif, ou par chromatographie etc.

La présente invention est décrite plus particulièrement en référence aux exemples non limitatifs suivants. Le dosage quantitatif du lactose et du produit de transfert de galactose dans les exemples a été fait en déterminant la surface de pic en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (pompe : Model 655 fabriquée par Hitachi Ltd., détecteur : SE-51 fabriqué par Showa Denko Co., Ltd., colonne : Shodex-S801 ; solvant : eau).

Exemple 1

Dans un ballon de 500 ml, on a chargé 50 ml d'un milieu (pH 7,0) contenant 1,0 g/dl de lactose, 1,0 g/dl de glycérol, 1,0 g/dl d'extrait de levure, 1,0 g/dl de polypeptone, 0,5 g/dl de



(NH₄)₂SO₄, 0,3 g/dl de K₂HPO₄, 0,1 g/dl de KH₂PO₄ et 0,05 g/dl de MgSO₄·7H₂O puis on a stérilisé à 115°C pendant 15 min. On a inoculé chaque fois le milieu au moyen d'une boucle de platine avec

05 Rhodotorula minuta IFO 879, Sterigmatomyces elviae AJ 14199 (FERM BP-2586, FERM P-10001), Cryptococcus laurentii IFO 609, Geotrichum amycelicum AJ 14196 (FERM P-10071), Apiotrichum humicola ATCC 14438 et Sirobasidium magnum CBS 6803, qui avaient été cultivés dans un milieu de gélose à l'extrait de malt à 25°C pendant 2 jours et

10 avec Corynebacterium michiganense ATCC 492, Bacillus megaterium AJ 1272 (FERM P-3747), Flavobacterium aurantium AJ 2462 (FERM P-10069) et Rhizobium meliloti AJ 2823 (FERM P-8197), qui avaient été cultivés dans un milieu de gélose au bouillon à 30°C pendant 24 h, puis on a effectué la culture agitée à 30°C pendant 2 jours dans le cas de IFO 879, AJ 14199 (FERM BP-2586, FERM P-10001), IFO

15 609, AJ 14196 (FERM P-10071), ATCC 14438 et CBS 6803 et pendant 24 h dans le cas de ATCC 492, AJ 1272 (FERM P-3747), AJ 2462 (FERM P-10069) et AJ 2823 (FERM P-8197).

Les cellules bactériennes ont été remises en suspension dans 50 ml de solution de substrat (tampon au phosphate 50 mM, pH

20 7,0) supplémentée avec 2,5 g de lactose et 5 g de chacun des sucres indiqués dans le tableau 1 pour les faire réagir à 50°C pendant 24 h. Les quantités de produits de transfert de galactose dans les solutions de réaction sont indiquées dans le tableau 1.



Tableau 1
Quantité de produit de transfert de galactose sur chaque sucre ((Gal)n-R total) (g/dl)

	Lactu- lose	Raffinose	Mel- tibi- ose	Galactose	Ribose	Arabi- nose	Xylose	Rhamnose	2-désoxy- glucose	Sorbose	N-acétyl- gluco- samine	fructose	α-méthyl- glucoside	α-méthyl- mannoside
<u>Rhodotorula</u> <u>minuta</u> IF0 879	1,7	1,2	1,2	1,4	1,5	1,2	1,0	0,8	0,7	0,9	0,4	0,3	0,5	0,4
<u>Sterigmatomyces</u> <u>elviae</u> AJ 14199 (FERM BP-2586) (FERM P-10011)	1,8	0	1,3	1,4	1,6	1,2	1,1	0,8	0,8	1,0	0,5	0,2	0,6	0,5
<u>Cryptococcus</u> <u>Laurentii</u> IF0 609	1,2	0	0	0,3	0,4	0	0,3	0	0,2	0,2	0	0,1	0	0
<u>Geotrichum</u> <u>amyelicum</u> AJ 14196 (FERM P-10071)	1,4	0,4	0,9	0,2	0,2	0,2	0	0	0,2	0,3	0	0,1	0	0
<u>Apiotrichum</u> <u>humicola</u> ATCC 14438	1,1	0,3	0,7	0,2	0,2	0	0	0	0,2	0,3	0	0	0	0
<u>Sirobasidium magnum</u> CBS 6803	1,6	0,5	1,3	1,4	1,2	1,1	1,0	0,6	0,5	0,8	0,3	0,3	0,3	0,3



Tableau 1 (suite)
Quantité de produit de transfert de galactose sur chaque sucre ((Gal)n-R total) (g/dl)

	Lactulose	Raffinose	Milibiose	Galactose	Ribose	Arabi-		Xylose	2-désoxy-		N-acétyl-		Fructose	α-méthyl-α-méthyl- glucoside mannoside
						nose	glucose		sorbitose	sorbitose	gluco-	samine		
<i>Corynebacterium michiganensis</i> ATCC 492	1,0	0,6	0,8	0,2	0,3	0,6	0,8	0	0,3	0,3	0	0	0,1	0
<i>Bacillus megaterium</i> AJ 1272 (FERM P-3747)	0,8	0,1	0,3	0,2	0,3	0	0	0	0,2	0,2	0	0	0	0
<i>Flavobacterium aurantianum</i> AJ 2462 (FERM P-10069)	0,8	0,4	0,4	0,2	0,3	0,5	0,6	0,1	0,3	0,3	0	0	0	0
<i>Rhizobium meliloti</i> AJ 2823 (FERM P-8197)	0,8	0,5	0,8	0,2	0,2	0,7	0,7	0,2	0,4	0,3	0	0	0	0



Exemple 2

05 Les cellules ont été préparées de manière semblable à l'exemple 1. Les cellules préparées ont été remises en suspension dans 50 ml de solution de substrat (dans le tampon au phosphate 50 mM, pH 7,0) supplémentée avec 2,5 g de lactose et 5 g de chacun des alcools des sucres et alcools indiqués dans le tableau 2 pour les faire réagir à 50°C pendant 24 h. Les quantités de produits de transfert de galactose dans les solutions de réaction sont indiquées dans le tableau 2.



Tableau 2
Quantité de produit de transfert de galactose sur chaque sucre des alcools ou alcool ((Gal)n-R total)
(g/dl)

	Inositol	Sorbitol	Mannitol	Xylitol	Glycérol
<u>Rhodotorula</u> <u>minuta</u> IFO 879	2,2	2,1	2,3	1,2	0,9
<u>Sterigmatomyces elviae</u> AJ 14199 (FERM BP-2586) (FERM P-10001)	2,4	2,2	2,4	1,3	0,8
<u>Cryptococcus</u> <u>laurentii</u> IFO 609	0,6	0,5	0,5	1,0	0,6
<u>Geotrichum amycelicum</u> AJ 14196 (FERM P-10071)	0,4	0,4	0,5	0,4	0,2
<u>Apiotrichum humicola</u> ATCC 14438	0	0,1	0,1	0,3	0,2
<u>Sirobasidium magnum</u> CBS 6803	2,0	2,0	2,1	1,0	0,7
<u>Corynebacterium</u> <u>michiganensis</u> ATCC 492	0,2	0,3	0,2	0,3	0,4
<u>Bacillus megaterium</u> AJ 1272 (FERM P-3747)	0	0,1	0,1	0,2	0,2
<u>Flavobacterium aurantianum</u> AJ 2462 (FERM P-10069)	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4
<u>Rhizobium meliloti</u> AJ 2823 (FERM P-8197)	0	0,1	0,2	0,3	0,5



Exemple 3

05 Les cellules ont été préparées de manière semblable à l'exemple 1. Les cellules préparées ont été remises en suspension dans 10 ml de solution de substrat (dans le tampon au phosphate 50 mM, pH 7,0) supplémentée avec 0,5 g de lactose et 1,0 g de chacun des nucléosides indiqués dans le tableau 3 pour les faire réagir à 50°C pendant 24 h. Les quantités de produits de transfert de galactose dans les solutions de réaction sont indiquées dans le tableau 3.



Tableau 3

Quantité de produit de transfert de galactose sur chaque nucléoside ((Gal)n-R total) (g/dL)

	<u>Adénosine</u>	<u>Guanosine</u>	<u>Inosine</u>	<u>Cytidine</u>	<u>Uridine</u>	<u>2-désoxy- adénosine</u>
<u>Rhodotorula</u> <u>minuta</u> IF0 879	1,8	0,3	2,6	2,6	2,6	2,4
<u>Sterigmatomyces elviae</u> AJ 14199 (FERM BP-2586) (FERM P-10001)	1,9	0,2	2,7	2,6	2,6	2,3
<u>Cryptococcus</u> <u>laurentii</u> IF0 609	1,3	0	1,5	1,6	1,5	1,4
<u>Geotrichum amycelicum</u> AJ 14196 (FERM P-10071)	1,2	0,1	0,6	1,0	0,9	0,6
<u>Apiotrichum humicola</u> ATCC 14438	0,4	0,2	0,5	0,3	0,3	0,3
<u>Sirobasidium magnum</u> CBS 6803	1,7	0,1	2,4	2,5	2,4	2,2
<u>Corynebacterium</u> <u>michiganensis</u> ATCC 492	1,3	0,1	1,0	1,3	1,1	0,4
<u>Bacillus megaterium</u> AJ 1272 (FERM P-3747)	0,6	0,1	0,5	0,2	0,3	0,2
<u>Flavobacterium aurantianum</u> AJ 2462 (FERM P-10069)	1,2	0,2	0,8	1,2	1,0	0,6
<u>Rhizobium meliloti</u> AJ 2823 (FERM P-8197)	1,1	0,2	0,9	1,1	0,8	0,5



Exemple 4

05 Les cellules ont été préparées de manière semblable à l'exemple 1. Les cellules préparées ont été remises en suspension dans 10 ml de solution de substrat (dans le tampon au phosphate 50 mM, pH 7,0) supplémentée avec 0,15 g de o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside et 1,0 g de chacun des nucléosides indiqués dans le tableau 4 pour les faire réagir à 50°C pendant 20 h. Les quantités de produits de transfert de galactose dans les solutions de réaction sont indiquées dans le tableau 4.



Tableau 4
Quantité de produit de transfert de galactose sur chaque nucléoside ((Gal)n-R total) (g/dl)

	<u>Adénosine</u>	<u>Guanosine</u>	<u>Inosine</u>	<u>Cytidine</u>	<u>Uridine</u>	<u>2-désoxy- adénosine</u>
<u>Rhodotorula</u> <u>minuta</u> IF0 879	0,7	0,2	1,3	1,3	1,3	1,3
<u>Sterigmatomyces elviae</u> AJ 14199 (FERM BP-2586) (FERM P-10001)	0,7	0,2	1,4	1,4	1,4	1,3
<u>Cryptococcus</u> <u>laurentii</u> IF0 609	0,4	0,1	0,8	0,9	0,8	0,2
<u>Geotrichum amycelicum</u> AJ 14196 (FERM P-10071)	0,4	0,1	0,3	0,5	0,4	0,1
<u>Apiotrichum humicola</u> ATCC 14438	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2
<u>Sirobasidium magnum</u> CBS 6803	0,6	0,2	1,2	1,3	1,3	1,3
<u>Corynebacterium</u> <u>michiganensis</u> ATCC 492	0,6	0,1	0,6	0,5	0,6	0,2
<u>Bacillus megaterium</u> AJ 1272 (FERM P-3747)	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
<u>Flavobacterium aurantianum</u> AJ 2462 (FERM P-10069)	0,5	0,2	0,4	0,6	0,5	0,3
<u>Rhizobium meliloti</u> AJ 2823 (FERM P-8197)	0,5	0,1	0,5	0,6	0,4	0,3



Exemple 5

Le cellules de Rhodotorula minuta IFO 879 ont été préparées de manière semblable à l'exemple 1. Les cellules préparées ont été remises en suspension dans 50 ml de solution de substrat (dans le tampon au phosphate 50 mM, pH 7,0) supplémentée avec 2,5 g de lactose et 5 g d'inosine pour les faire réagir à 50°C pendant 48 h. Les quantités des produits de transfert de galactose dans la solution de réaction sont indiquées dans le tableau 5.

10

Tableau 5

Quantités de produits de transfert de galactose à base d'inosine
(g/dl)

	<u>1 reste galactose</u>	<u>2 restes galactose</u>	<u>3 restes galactose ou plus</u>
15	1,4	0,8	0,4

Exemple 6

Dans un ballon de 500 ml, on a chargé 50 ml d'un milieu (pH 7,0) contenant 10,0 g/dl de lactose, 2,0 g/dl de glycérol, 0,05 g/dl d'extrait de levure, 0,5 g/dl de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3 g/dl de K_2HPO_4 , 0,1 g/dl de KH_2PO_4 et 0,05 g/dl de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, puis on a stérilisé à 115°C pendant 15 min.

On a inoculé le milieu chaque fois au moyen d'une boucle de platine avec Rhodotorula minuta IFO 879, Sterigmatomyces elviae FERM P-10001 ou Sirobasidium magnum CBS 6803, qui avait été cultivé dans un milieu de gélose à l'extrait de malt à 25°C pendant 2 h, puis on a effectué la culture agitée à 30°C pendant 4 jours. Les quantités respectives des galacto-oligosaccharides produits dans les liquides surnageants respectifs dans les solutions de culture résultantes sont indiquées dans le tableau 6.



Tableau 6

		Lactose résiduel (g/dl)	Galacto-oligosaccharide produit	
			Trisaccharide (g/dl)	Tétrasaccharide ou plus (g/dl)
05	<u>Rhodotorula</u> <u>minuta</u> IFO 879	0,8	4,2	2,6
10	<u>Sterigmatomyces</u> <u>elviae</u> FERM BP-2586 FERM P-10001	2,1	6,7	0
15	<u>Sirobasidium</u> <u>magnum</u> CBS 6803	1,8	5,2	1,9

Exemple 7

Dans un ballon de 500 ml on a chargé 50 ml d'un milieu (pH 7,0) contenant 1,0 g/dl de lactose, 2,0 g/dl de glycérol, 1,0 g/dl d'extrait de levure, 1,0 g/dl de polypeptone, 0,5 g/dl de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3 g/dl de K_2HPO_4 , 0,1 g/dl de KH_2PO_4 et 0,05 g/dl de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, puis on a stérilisé à 115°C pendant 15 min.

On a inoculé le milieu chaque fois au moyen d'une boucle de platine avec Rhodotorula minuta IFO 879, Sterigmatomyces elviae FERM P-10001 ou Sirobasidium magnum CBS 6803, qui avait été cultivé dans un milieu de gélose à l'extrait de malt pendant 2 jours, puis on a effectué la culture agitée à 30°C pendant 4 jours. Après la fin de la culture, les cellules bactériennes ont été recueillies par centrifugation et lavées une fois avec la même quantité de sérum physiologique que la solution de culture pour recueillir les cellules.

Les cellules ont été remises en suspension dans 50 ml de solution à 22 g/dl de lactose (dans le tampon au phosphate 50 mM, pH 7,0) pour les faire réagir à 50°C pendant 2 jours. La composition en sucres de la solution de réaction est indiquée dans le tableau 7.



Tableau 7

	Lactose résiduel (g/dl)	Galacto-oligosaccharide produit	
		Trisaccharide (g/dl)	Tétrasaccharide ou plus (g/dl)
05			
<u>Rhodotorula</u>			
<u>minuta</u> IFO 879	9,6	8,4	1,7
10			
<u>Sterigmatomyces</u>			
<u>elviae</u>			
FERM BP-2586			
FERM P-10001	10,5	9,3	0
15			
<u>Sirobasidium</u>			
<u>magnum</u> CBS 6803	11,2	8,0	0,6

Exemple 8

20 Dans un fermenteur de 5 l on a chargé 2 l d'un milieu à pH 7,0 contenant 1,0 g/dl de lactose, 2,0g/dl de glycérol, 1,0 g/dl d'extrait de levure, 1,0 g/dl de polypeptone, 0,5 g/dl de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3 g/dl de K_2HPO_4 , 0,1 g/dl de KH_2PO_4 et 0,05 g/dl de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. On a inoculé le milieu avec Rhodotorula minuta IFO 879, Sterigmatomyces elviae FERM P-10001 et Sirobasidium magnum CBS 6803, respectivement, puis on a effectué la culture aérobie à 30°C

25 pendant 36 h avec agitation à 500 tr/min avec aération à 1/2 min⁻¹. Chaque solution de culture a été centrifugée pour donner les cellules bactériennes qui ont été utilisées comme source d'enzyme. On a ensuite effectué les étapes suivantes.

30 Etape (1) : Les cellules résultantes ont été remises en suspension dans 2 l de solution à 36 g/dl de lactose (dans le tampon au phosphate 50 mM, pH 6,0) pour les faire réagir à 30°C avec agitation par aération.

35 Etape (2) : après réaction pendant 3 jours, la solution de réaction a été soumise à la filtration avec recyclage à travers une membrane d'ultrafiltration en polysulfone (fabriquée par Amicon Inc.) jusqu'à ce que le volume de la solution extérieure soit de



1000 ml. Ensuite, on a ajusté la quantité de solution intérieure à 2 l, la concentration de lactose à 36 g/dl et le pH à 6,0, respectivement. L'opération de l'étape (2) a été répétée 4 fois. La concentration de galacto-oligosaccharide dans la solution extérieure dans cette opération est indiquée dans le tableau 8.

L'ultrafiltration a été effectuée sous une pression moyenne de filtration de 1 bar à une température de 30°C.

Dans l'exemple suivant, la pression de filtration moyenne et la température dans l'ultrafiltration étaient indiquées dans les mêmes conditions.

Tableau 8
Concentration de galacto-oligosaccharide dans la solution
extérieure (g/dl)

15	Numéro d'opération	1 ^{ère}	2 ^{ème}	3 ^{ème}	4 ^{ème}
	Source d'enzyme :				
20	<u>Rhodotorula</u> <u>minuta</u> IFO 879	21,6	22,6	21,2	21,3
	<u>Sterigmatomyces</u> <u>elviae</u>				
25	FERM BP-2586				
	FERM P-10001	21,4	21,2	20,8	20,6
	<u>Sirobasidium</u> <u>magnum</u> CBS 6803	19,5	19,3	19,8	18,9



REVENDECATIONS

05 1. Procédé pour la fabrication d'un produit de transfert de galactose, caractérisé en ce qu'on fait agir sur le lactose ou un donneur de galactose tel que o-nitrophényl-β-D-galactopyrannoside, et un récepteur de galactose tel qu'un sucre, un alcool des sucres, un nucléoside, un alcool et leurs dérivés, un
10 micro-organisme capable de produire à partir du lactose ou d'un donneur de galactose tel que o-nitrophényl-β-D-galactopyrannoside et d'un récepteur de galactose tel qu'un sucre, un alcool des sucres, un nucléoside, un alcool et leurs dérivés, un produit de transfert de galactose représenté par la formule générale :

15 $(Gal)_n-R$

dans laquelle Gal représente un reste de galactosé, n représente un entier de 1 à 4 et R représente un reste de sucre, d'alcool des sucres, de nucléoside, d'alcool et leurs dérivés, et on recueille
20 le produit de transfert de galactose produit.

2. Procédé pour la fabrication d'un produit de transfert de galactose selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit donneur de galactose est le lactose et ledit récepteur de galactose est le lactose

25 3. Procédé pour la fabrication d'un produit de transfert de galactose selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit micro-organisme capable de produire un produit de transfert de galactose appartient au genre Rhodotula, Sterigmatomyces, Cryptococcus, Geotrichum, Apiotrichum, Corynebacterium, Bacillus,
30 Flavobacterium, Rhizobium ou Sirobasidium.

